

Aus dem
Institut für Bakteriologie und Mykologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und dem Institut für
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

**Identifizierung des zellulären Rezeptors für das
binäre Toxin von *Clostridium spiroforme***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Claudia Wilczek
aus Wodzisław

Leipzig, 2015

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Monika Krüger
Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories

Gutachter: Prof. Dr. Monika Krüger, Institut für Bakteriologie und Mykologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories, Institut für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg
Prof. Dr. Joachim Frey, Institut für Veterinär-Bakteriologie der
Vetsuisse-Fakultät Universität Bern

Tag der Verteidigung: 26.08.2014

.....meiner Oma in Liebe....

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I-III
1 EINLEITUNG	1
1.1 CLOSTRIDIEN	1
1.2 CLOSTRIDIUM SPIROFORME	1
1.3 CLOSTRIDIALE BINÄRE AKTIN-ADP-RIBOSYLIERENDE TOXINE.....	3
1.3.1 Aktin-ADP-ribosylierende Toxinfamilien.....	3
1.3.2 Aufbau der Toxine (Abb. 1)	3
1.3.3 Wirkmechanismus (Abb. 2).....	4
1.3.4 Zelluläre Toxin-Aufnahme (Abb. 3).....	6
1.4 LIPOLYSE-STIMULIERTER LIPOPROTEINREZEPTOR (LSR, ENGL. LIPOLYSIS-STIMULATED LIPOPROTEIN RECEPTOR)	7
1.5 ZIEL DER ARBEIT.....	8
2 MATERIALIEN UND METHODEN	9
2.1 MATERIALIEN	9
2.1.1 Nährmedien.....	9
2.1.2 Antibiotika	9
2.1.3 Eukaryote Zelllinien	9
2.1.4 Kulturmedien und Kulturmedium-Zusätze	10
2.1.5 Vektoren	10
2.1.6 Bakterienstämme.....	10
2.1.7 Primer	11
2.1.8 Enzyme.....	11
2.1.9 DNA-Marker	12
2.1.10 Protein-Marker.....	12
2.1.11 Antikörper und Antiseren.....	12
2.1.12 Kits	12
2.1.13 Radionukleotide	12
2.1.14 Puffer und Lösungen	12
2.1.15 Sonstige Biochemikalien und Materialien.....	13
2.1.16 Geräte.....	14
2.1.17 Computerprogramme	15
2.1.18 Dienstleister.....	15
2.2 METHODEN.....	16
2.2.1 Arbeiten mit DNA.....	16
2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. <i>polymerase chain reaction</i>).....	16

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	17
Durchführung:	17
2.2.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten	18
2.2.1.3.1 QIAquick PCR Purification Kit	18
2.2.1.3.2 Extraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit	18
2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels UV-Photometrie.....	19
2.2.1.5 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten.....	19
2.2.1.6 Vektor- Dephosphorylierung.....	20
2.2.1.7 Ligation	20
2.2.1.8 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> mit der Calcium-Chlorid-Methode	21
2.2.1.9 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i>	21
2.2.1.10 Aufreinigung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab	22
2.2.1.11 DNA-Sequenzierung.....	22
2.2.1.12 Transformation von Plasmid-DNA in <i>B. megaterium</i> -Protoplasten	23
2.2.1.13 Aufreinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab	23
2.2.1.14 Herstellen von Glycerolstocks	24
2.2.2 Arbeiten mit Proteinen	24
2.2.2.1 Proteinexpression im <i>Bacillus-megaterium</i> -Expression-System	24
2.2.2.2 Isolierung von Proteinen aus <i>B. megaterium</i> -Lysaten mittels Affinitätschromatographie.....	25
2.2.2.3 Umpuffern von Proteinlösungen mittels Entsalzungssäulen	26
2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
Herstellung von SDS-Gelen:	27
Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE:	28
Sichtbarmachung von Proteinen in SDS-Gelen durch Coomassie-Färbung:	28
2.2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	29
Durchführung:	29
2.2.2.6 Identifizierung von Proteinen.....	29
2.2.2.7 Aktin-Nach-ADP-Ribosylierung.....	29
2.2.2.8 Fluoreszenzfärbungen von Proteinen.....	30
2.2.2.8.1 Alexa- Labeling der aufgereinigten Proteine.....	30
2.2.2.8.2 Immunolabeling von Proteinen in kultivierten Zellen.....	30
2.2.3 Arbeiten mit Säugerzellen	31
2.2.3.1 Mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie	31
2.2.3.2 Aktin-Zytoskelett-Fluoreszenzfärbung.....	32
2.2.3.3 Crystal-Blue-Assay	33
2.2.3.4 FACS-Durchflusszytometrie.....	33
3 ERGEBNISSE	35
3.1 REKOMBINANTE HERSTELLUNG VON CSTA UND CSTB	35
3.1.1 Amplifizierung der Genabschnitte aus genomischer DNA	35
3.2.1 Expression von CSTa und CSTb in <i>B. megaterium</i>	36
3.2 REKOMBINANT HERGESTELLTES CST IST FUNKTIONELL UND WEIST AKTIN ADP-RIBOSYLIERENDE EIGENSCHAFTEN AUF	36

3.2.1 CST besitzt toxische Aktivität.....	37
3.2.2 Vergiftung von CaCo2-Zellen führt zum Kollaps des Aktin-Zytoskeletts.....	37
3.2.3 Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts ist Folge der Aktin-ADP-Ribosylierung durch rekombinantes CST.....	38
3.3 LSR IST DER OBERFLÄCHENREZEPTOR FÜR CST.....	39
3.3.1 Zellabrundung von H1-HeLa(+LSR)-Zellen durch CST-Vergiftung	39
3.3.2 Ablösung von H1-HeLa(+LSR)-Zellen nach CST-Vergiftung	40
3.3.3 Nach-ADP-Ribosylierung von Aktin aus H1-HeLa(+LSR)-Zellen.....	41
3.3.4 Bindung von CSTb an H1-HeLa(+LSR)-Zellen.....	42
3.3.5 Bindung von CSTb-Alexa488 an LSR	43
3.3.6 Kolokalisation von CST und LSR in endozytischen Vesikeln	44
4 DISKUSSION	46
5 ZUSAMMENFASSUNG	48
6 SUMMARY	50
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	52

Abkürzungsverzeichnis

ADP:	Adenosindiphosphat
APS:	Ammoniumperoxodisulfat
Arg:	Arginin
bp:	Basenpaare
BSA:	engl. <i>bovine serum albumine</i>
C:	Celsius
C2-Toxin:	<i>Clostridium botulinum</i> C2-Toxin
C2I:	<i>Clostridium botulinum</i> C2-Toxin Enzymkomponente
C2II:	<i>Clostridium botulinum</i> C2-Toxin Bindekomponente
CaCl ₂ :	Calciumchlorid
CDT:	<i>Clostridium difficile</i> -Transferase
CDTa:	<i>Clostridium difficile</i> -Transferase a; Enzymkomponente
CDTb:	<i>Clostridium difficile</i> -Transferase b; Bindekomponente
CST:	<i>Clostridium spiroforme</i> -Toxin
CSTa:	<i>Clostridium spiroforme</i> -Toxin a; Enzymkomponente
CSTb:	<i>Clostridium spiroforme</i> -Toxin b; Bindekomponente
C-terminal:	carboxyl-terminal
C-Terminus:	Carboxy-Terminus
DAPI:	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT:	Dithiothreitol
E. coli:	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH:	Ethanol
FACS:	engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
F-Aktin:	Filamentöses Aktin
FCS:	engl. <i>fetal calf serum</i>
FITC:	Fluorescein Isothiocyanat
g:	Gramm
G-Aktin:	Globuläres Aktin
h:	engl. <i>hour</i> , Stunde

HCl:	Chlorwasserstoff; Salzsäure
Hsp:	engl. <i>heat shock protein</i> ; Hitzeschockprotein
Ia:	Iota Toxin a
Ig:	Immunglobulin
K ₂ SO ₄ :	Kaliumsulfat
kB:	Kilobasen
KCl:	Kaliumchlorid
kDa:	Kilodalton
KH ₂ PO ₄ :	Kaliumdihydrogenphosphat
l:	Liter
IDA:	engl. <i>iminodiacetic acid</i>
LB-Medium:	Luria Bertani-Medium
LSR:	Lipolyse-stimulierter Lipoproteinrezeptor
MALDI:	engl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>
MCS:	engl. <i>multiple cloning site</i>
MgCl ₂ :	Magnesiumchlorid
min:	Minuten
ml:	Milliliter
mM:	Millimolar
MOPS:	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
m/v:	Masse pro Volumen
Na:	Natrium
Na ₂ HPO ₄ :	Dinatriumhydrogenphosphat
NAD:	Nicotinamidadeninnukleotid
NaCl:	Natriumchlorid; Kochsalz
NaHCO ₃ :	Natriumhydrogencarbonat
NaOH:	Natriumhydroxid
NEA:	nicht-essentielle Aminosäuren
ng:	Nanogramm
Ni:	Nickel
nM:	Nanomolar
N-terminal:	amino-terminal
OD:	Optische Dichte
OD _{600nm} :	optische Dichte bei 600 nm
³² P:	Phosphor-32

PA:	engl. <i>protective antigen</i> ; Protektives Antigen
PBS:	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR:	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PEG:	Polyethylenglykol
PFA:	Paraformaldehyd
RT:	Raumtemperatur
SDS:	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SDS- PAGE:	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sec:	Sekunden
SOC-Medium:	engl. <i>Super Optimal broth with Catabolite repression-Medium</i>
T:	Temperatur
TAE:	Tris-Acetat-EDTA; Tris-Essigsäure-EDTA
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TOF:	engl. <i>time of flight</i>
Tris:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC:	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
Tween:	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
UV:	Ultra-Violett
ÜN:	Über Nacht
v/v:	Volumen pro Volumen

1 EINLEITUNG

1.1 Clostridien

Clostridien (griechisch „kloster“ = Spindel) sind ubiquitär vorkommende, anaerobe, Sporen-bildende Bakterien vom Stamm der *Firmicutes* (lateinisch „firmus“ = stark und „cutis“ = Haut). Sie sind auf der ganzen Welt im Boden, in Gewässern und im Gastrointestinaltrakt von Menschen und Tieren zu finden.

Erkrankungen welche durch Clostridien hervorgerufen werden, waren bereits im Altertum bekannt. Clostridien verursachen eine Reihe von schweren Krankheitsbildern. Dazu gehören z. B. Botulismus, Tetanus und Gasbrand (Clostridien-Myositis). Sie können aber auch an putriden Infektionen beteiligt sein oder gastrointestinale Infektionen verursachen, wie z.B. die Antibiotika-assoziierte Diarrhoe durch *C. difficile* und intestinale Infektionen durch *C. perfringens*.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit *Clostridium spiroforme*, einem Bakterium, das schwere Durchfallerkrankungen beim Kaninchen verursachen kann.

1.2 Clostridium spiroforme

Clostridium spiroforme ist ein anaerobes, sporenbildendes, gram-positives, helikales Bakterium aus der Familie der Bazillen.

Es wird häufig im Verdauungstrakt von Kaninchen gefunden und ist bei dieser Spezies für schwere Durchfallerkrankungen verantwortlich, die häufig tödlich enden (CARMAN und BORRIELLO 1982). *C. spiroforme* gehört nicht zur normalen Darmflora von Kaninchen (CARMAN und BORRIELLO 1984). Alle Stämme produzieren ein Toxin, welches mit dem Iota-Antitoxin von *Clostridium perfringens* Typ E neutralisiert werden kann (BORRIELLO und CARMAN 1983).

Prädisponierende Faktoren für *Clostridium spiroforme*-assoziierte Durchfälle sind z.B. Absetzen, Antibiotikaexposition und Stress wie hohes Alter und Futterumstellung (CARMAN und EVANS 1984). Laut CARMAN und BORRIELLO (1984) reicht bei frisch abgesetzten Kaninchen *C. spiroforme* allein aus, um Durchfälle zu verursachen, während bei erwachsenen Kaninchen Durchfälle erst im Zusammenhang mit Antibiotika-Gabe (Clindamycin) entstehen.

EINLEITUNG

Der Erreger ist in vielen Kaninchenhaltungen anzutreffen und meist mit anderen Erregern wie Kokzidien, enteropathogenen *E. coli* oder Viren vergesellschaftet.

Beim Krankheitsausbruch kommt es zu einer hämorrhagischen Typhlitis. Typisch ist eine Cäkumdilatation mit wässrigem Inhalt. Die epitheliale Cäkumoberfläche ist nekrotisch und bei der histologischen Untersuchung werden inflammatorische Infiltrate in der Lamina propria beobachtet.

Die Virulenz von *Clostridium spiroforme* hängt stark mit der Bildung des Enterotoxins CST (*Clostridium spiroforme* Toxin) zusammen (BORRIELLO und CARMAN 1983). CST gehört zur Familie der clostridialen binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine. Das Toxin besteht, wie alle Toxine dieser Familie, aus zwei Komponenten. Die Enzymkomponente von *C. spiroforme* (CSTa) besitzt Mono(ADP-ribosyl)-Transferase-Aktivität, die separate Bindekomponente (CSTb) ist verantwortlich für den Zelleintritt der Enzymkomponente (STILES et al. 2001).

Die Pathogenität von *C. spiroforme* für Kaninchen wurde 1982 klar; im selben Zeitraum wurde gezeigt, dass es möglich ist die Krankheit durch orale Verabreichung von Lincomycin experimentell zu reproduzieren. Als indirekter Beweis, dass die meisten sporadischen Ausbrüche Antibiotika-assoziiert sind, ist die Tatsache, dass Kaninchen die versehentlich mit kontaminiertem Futter gefüttert wurden, welches kleine Mengen an Amoxicillin enthielt, klinische Symptome entwickelten. Sie zeigten ernsthafte Erkrankungserscheinungen, welche mit einer Imbalance der zäkalen Mikroflora einhergingen. Es kam zu einer abnormalen Proliferation von *C. spiroforme* durch die Zerstörung antagonisierender Bakterien aufgrund der β -Lactame. Ein ähnlicher Mechanismus ist in der „Antibiotika-assoziierten Diarrhoe“, verursacht durch *C. difficile*, zu beobachten und betrifft einige Tiere und den Mensch. Neben der Tatsache der versehentlichen Verabreichung von Antibiotika ist der verstärkte Gebrauch von Antimikrobiotika zur Kontrolle der Durchfälle sicher ein Faktor für die gestiegene Häufigkeit von *C. spiroforme* Clostridiosen, welche insbesondere kommerzielle Mastbetriebe betreffen. Andere Triggerfaktoren beziehen z. B. eine zu proteinreiche Nahrung wie sie bei Mastkaninchen üblich ist ein, wodurch eine Erhöhung der Trypsinsekretion induziert wird. Diese ist durch die

enzymatische Spaltung von CSTa und CSTb ein potenter Aktivator des binären Toxins. Kohlenhydratreiche und faserarme Nahrung kann ebenfalls eine clostridiale Überladung verursachen (AGNOLETTI et al. 2008).

1.3 Clostridiale binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine

1.3.1 Aktin-ADP-ribosylierende Toxinfamilien

Clostridiale binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine werden aufgrund ihrer biologischen Aktivität und ihrer immunologischen Verwandtschaft in zwei Toxinfamilien eingeteilt.

Zur ersten Gruppe gehören Stamm-spezifische Varianten des C2-Toxins von *C. botulinum*. Zur zweiten Gruppe gehören das Iota-Toxin von *C. perfringens*, CDT (*C. difficile* transferase) sowie CST (*C. spiroforme* Toxin) (ROOD et al. 1997).

Diese Toxine werden auch als Iota-Toxin-Familie zusammengefasst.

Die Enzym- und Bindekomponenten können innerhalb der beiden Toxin-Gruppen untereinander ausgetauscht werden, um ein funktionelles, binäres Aktin-ADP-ribosylierendes Toxin zu erhalten; dies gelingt nicht, wenn man jeweils eine Komponente aus der C2- und eine aus der Iota-Toxin-Familie miteinander kombiniert (STILES et al. 2011).

1.3.2 Aufbau der Toxine (Abb. 1)

Clostridiale binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine bestehen aus einer biologisch aktiven Enzymkomponente A und einer separaten Bindekomponente B. Die biologisch aktive A-Komponente ist für die Modifizierung von Aktin durch ADP-Ribosylierung verantwortlich (AKTORIES et al. 1986). Die B-Komponente vermittelt die Bindung des Toxins an die Zielzelle und die Translokation der ADP-Ribosyltransferase ins Zytosol (OHISHI et al. 1981). Die Bindekomponenten der Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine weisen eine molekulare Masse von ca. 100 kDa auf und werden zunächst durch proteolytische Spaltung aktiviert (OHISHI 1987). Dabei wird ein ca. 20 kDa großes Fragment abgelöst und es kommt zur Oligomerisierung des Hauptfragments und in der Folge zur Bildung von Heptameren (BARTH et al. 2000). Die Bindekomponente der binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine hat große Ähnlichkeit mit der Bindekomponente PA

EINLEITUNG

(*protective antigen*) des Anthrax-Toxins (YOUNG und COLLIER 2007). Die Untersuchungen zum Anthrax-Toxin waren von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Aufnahme der clostridialen binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine. Entsprechend dem PA-Modell besteht die Bindekomponente aus 4 verschiedenen Domänen (PETOSA et al. 1997; SCHLEBERGER et al. 2006; YOUNG und COLLIER 2007). Domäne 1 ist an der proteolytischen Aktivierung der Bindekomponente beteiligt. Domäne 2 ist verantwortlich für die Membran-Insertion. Domäne 3 vermittelt die Oligomerisierung der B-Komponente. Domäne 4 stellt schließlich die Rezeptorbindedomäne dar.

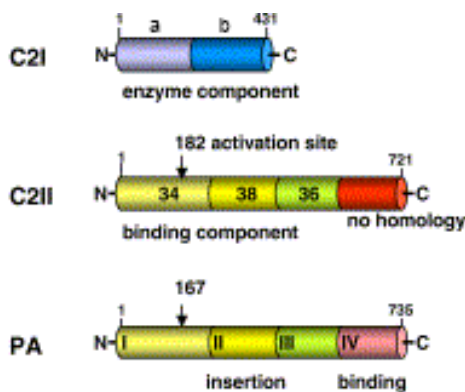


Abb. 1 Model der Struktur von clostridialen binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen am Beispiel vom C2-Toxin (entnommen aus BLÖCKER et al. 2000). Binde (C2II)- und Enzymkomponente (C2I) des C2-Toxins. Homologie der Sequenzen zwischen C2II und PA sind prozentual angegeben. Entsprechend zu PA, wird C2II in 4 Domänen unterteilt. Es existiert keine Übereinstimmung am C-Terminus. Die proteolytische Aktivierung von C2II findet am Rest 182 statt. Die Enzymkomponente des C2-Toxins besteht aus zwei Domänen. Die N-terminale Domäne (a) dient der Bindung an die Bindekomponente C2II. Der C-terminale Teil (b) ist die ADP-Ribosyltransferase-Domäne.

1.3.3 Wirkmechanismus (Abb. 2)

Der Wirkmechanismus der clostridialen binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine wurde am eingehendsten am *C. botulinum* C2-Toxin und am *C. perfringens* Iota-Toxin untersucht.

EINLEITUNG

Vertreter der C2- und Iota-Toxin-Familie ADP-ribosylieren monomeres G-Aktin, aber nicht polymeres F-Aktin (AKTORIES et al. 1986); NAD wird hierbei als Substrat genutzt.

Die ADP-Ribosylierung vom monomeren G-Aktin findet an der Akzeptoraminosäure Arginin-177 statt. Die ADP-Ribosylierung blockiert in der Folge die Polymerisierung von Aktinfilamenten: ADP-ribosyliertes G-Aktin kann sich zwar noch an das wachsende Aktinfilament anlagern, jedoch wird die Bindung weiterer G-Aktinmoleküle an das schnell wachsende „Plusende“ („capping“), durch den gebundenen ADP-Riboserest verhindert (WEGNER und AKTORIES 1988; WEIGT et al. 1989). Aktin, welches dann am langsam wachsenden „Minusende“ abdissoziiert, steht der bakteriellen ADP-Ribosyltransferase als Substrat zur Verfügung. Durch die Modifizierung verliert es seine Polymerisierbarkeit („trapping“) (AKTORIES und JUST 1990). Die Polymerisierung am „Plusende“ ist somit blockiert aber die Depolymerisierung am „Minusende“ bleibt unbeeinflusst. Dies führt schließlich zum Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts. Kultivierte Zellen, welche mit diesen Toxinen inkubiert wurden, runden in der Folge ab (AKTORIES und WEGNER; 1992; REUNER et al. 1987).

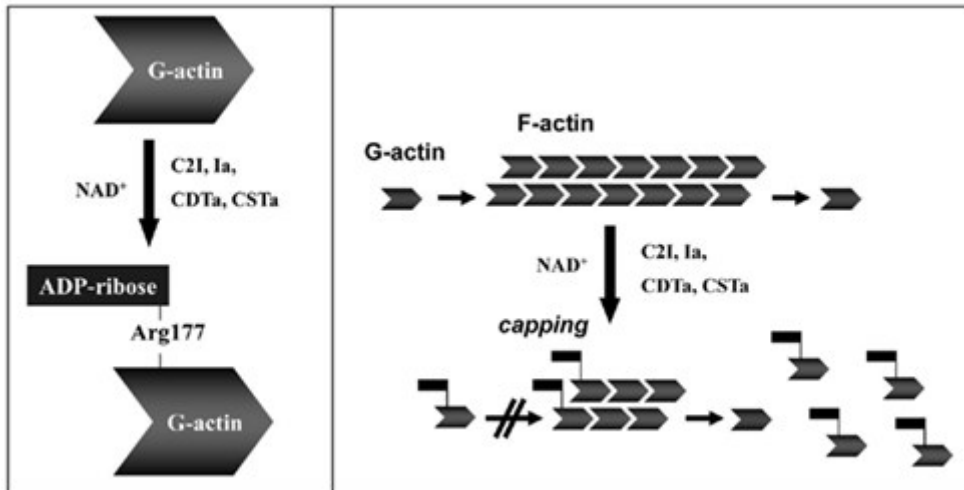


Abb. 2: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus der Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine (nach STILES et al. 2011)

1.3.4 Zelluläre Toxin-Aufnahme (Abb. 3)

Nach der proteolytischen Aktivierung lagern sich die Bindekomponenten zu porenbildenden Heptameren zusammen und binden an den Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle. Die Enzymkomponente bindet in der Folge an die Heptamere. Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose und endosomaler Ansäuerung, inseriert das Heptamer in die Endosomenmembran. Durch die hierbei entstehende Pore wird die Enzymkomponente ins Zytosol transloziert (AKTORIES et al. 2012). Chaperone (u. a. Hsp90) unterstützen die Aufnahme der Enzymkomponente ins Zytosol (KAISER et al. 2011). Hinsichtlich der Bindung an den Rezeptor existieren zwei Modelle. Entsprechend dem ersten Model kommt es zuerst zur Prozessierung und Oligomerisierung der Bindekomponenten und anschließend zur Rezeptorbindung. Das zweite Model besagt, dass die Oligomerisierung der B-Komponenten erst auf der Zelloberfläche nach der Rezeptorbindung stattfindet.

Erst kürzlich wurde der Lipolyse-stimulierte Lipoproteinrezeptor (LSR, engl. *lipolysis-stimulated lipoprotein receptor*) mit Hilfe eines genetischen Screens, der auf humanen haploiden Zellen beruht, als der Zellmembranrezeptor für die *C. difficile* Transferase (CDT) und das *C. perfringens* Iota-Toxin identifiziert, welcher bei diesen beiden Toxinen die Bindung an die Zelloberfläche und den Zelleintritt ermöglicht (PAPATHEODOROU et al. 2011).

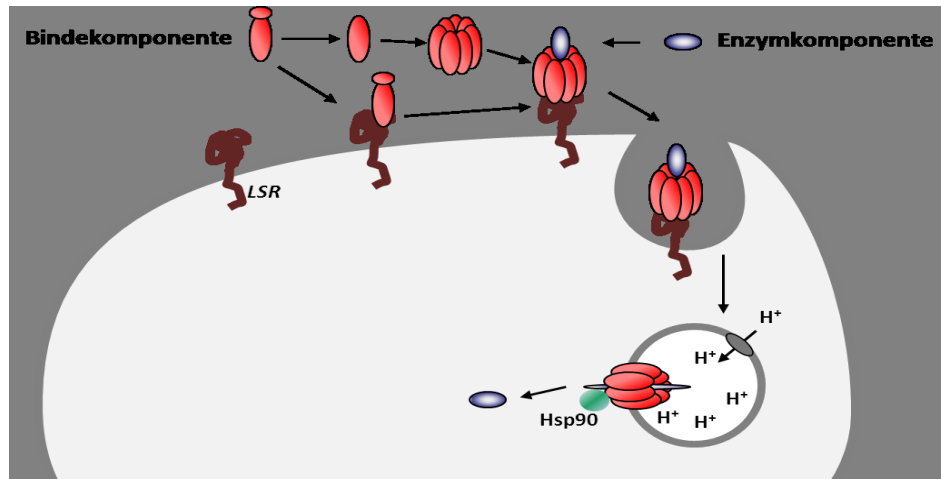


Abb. 3: Modell der Aufnahme und Wirkungsweise von binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen (entnommen und modifiziert aus AKTORIES 2012). Bindung der Heptamere an den LSR, Bindung der Enzymkomponente an das Oligomer, Endozytose, endosomale Ansäuerung, Porenbildung, Translokation der Enzymkomponente; Hsp90 ist an der Translokation der Enzymkomponente beteiligt.

1.4 Lipolyse-stimulierter Lipoproteinrezeptor (LSR, engl. lipolysis-stimulated lipoprotein receptor)

LSR ist ein Typ 1 Singlepass-Transmembran-Protein der Zellmembran und wird hauptsächlich in der Leber, aber auch im Darm und in verschiedenen anderen Geweben, exprimiert (MESLI et al. 2004; YEN et al. 1999). Dem Protein wurde eine Rolle bei der zellulären Aufnahme von Triglycerid-reichen und Low-Density-Lipoproteinen zur Clearance von Chylomikronen-Remnants aus dem Kreislauf zugesprochen (BIHAIN und YEN 1998; YEN et al. 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung des LSR-Gens Embryonentod in Mäusen verursacht, was seine zudem wichtige Rolle bei der Entwicklung offenlegt (MESLI et al. 2004). LSR spielt außerdem bei der Organisation von *tight junctions*, welche an der epithelialen Barrierefunktion beteiligt sind, eine Rolle (MASUDA et al. 2011). *Tight junction*-Proteine sind bekannt als Rezeptoren für Toxine und Viren.

Der N-terminale extrazelluläre Teil vom LSR besitzt eine Ig-ähnliche V-Typ Domäne. Beachtlich ist, dass der paarige Ig-ähnliche Typ-2 Rezeptor α oder das T-Zell-Ig und die Mucin-Domäne 1, welche als Rezeptor für Hepatitis A, Ebola und Marburg Viren fungieren, alle eine Ig-ähnliche V-Typ Domäne im

extrazellulär liegenden Teil der Rezeptoren besitzen. Typ-2-Rezeptor α ist ein Korezeptor für Glykoprotein B des Herpes simplex Virus-1.

Es ist noch unklar ob die Ig-ähnliche Domäne vom LSR direkt an der Bindung der clostridialen binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine, welche LSR für den Zelleintritt nutzen, beteiligt ist (PAPATHEODOROU et al. 2011).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Oberflächenprotein LSR konnte bereits als zellulärer Wirtszellrezeptor für die beiden Vertreter der Iota-Toxin-Familie, Iota-Toxin und CDT, identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob das *C. spiroforme* Toxin, welches ebenfalls zur Iota-Toxin-Familie gehört, LSR als Rezeptor für den Zelleintritt verwendet. Zu diesem Zweck sollen zunächst die beiden Toxin-Komponenten, CSTa und CSTb, im *Bacillus-megaterium*-Expression-System erstmals rekombinant hergestellt werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Nährmedien

Nährmedium für *Bacillus megaterium* und *Escherichia coli*:

- LB („Luria-Bertani“)-Medium (je 1 l):
10 g Bactotrypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, H₂O
- LB-Agarplatte: 500 ml LB-Medium mit 7 g Agar-Agar
- SOC- Medium: 10 mM Magnesiumchlorid und 20 mM Glucose in LB-Medium; kommt bei der Transformation von DNA in kompetente Zellen zum Einsatz

2.1.2 Antibiotika

- Ampicillin (100 µg/ml) (Roth, Karlsruhe)
- Tetrazyklin (100 µg/ml) (Sigma, Taufkirchen)

2.1.3 Eukaryote Zelllinien

Die Kultivierung der eukaryoten Zelllinien fand bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% im DMEM Kulturmedium mit den entsprechenden Kulturmedium-Zusätzen statt. Alle zwei Tage wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in frisches Medium überführt.

H1-HeLa-Zellen (ATCC: CRL-1958):

Humane epitheliale Zervix-Karzinomazelllinie

Kulturmedium: DMEM + 10% FCS, 1% Na-Pyruvat, 1% NEA,

Penicillin (4 mM), Streptomycin (4 mM)

Transduzierter LSR-Rezeptor: stammt von humanen Zellen, aus einer human pancreas adenocarcinoma cDNA library.

CaCo2-Zellen (ATCC: CRL-2102):

Humane Kolon-Adenokarzinom Zellen

MATERIALIEN UND METHODEN

Kulturmedium: DMEM+ 10% FCS, 1% Na-Pyruvat, 1% NEA,
Penicillin (4 mM), Streptomycin (4 mM), 1% Natriumpyruvat

2.1.4 Kulturmedien und Kulturmedium-Zusätze

Kulturmedium:

DMEM (Biochrom AG, Berlin)

Kulturmedium-Zusätze:

- Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin)
- Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach)
- Na-Pyruvat (PAN Biotech, Aidenbach)
- Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

2.1.5 Vektoren

pHis1522 (MoBiTec, Göttingen)

Der pHis-1522-Vektor besteht aus 7402 Basenpaaren und wurde als Expressionsvektor im *Bacillus-megaterium*-Expression-System zur Aufreinigung der rekombinant hergestellten Toxine verwendet.

2.1.6 Bakterienstämme

E. coli-Stämme

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue (Stratagene, LaJolla, USA) verwendet.

B. megaterium-Stämme

Zur Expression rekombinanter Proteine wurde der W320-Stamm (MoBiTec, Göttingen) verwendet.

Bacillus megaterium hat sich bereits in der rekombinanten Herstellung anderer clostridialer Toxine bewährt (PAPATHEODOROU et al.; 2010, GUTTENBERG et al.; 2011, YANG et al.; 2008, SCHWAN et al.; 2011) und wird daher in der vorliegenden Arbeit als Expressionswirt für die rekombinante Herstellung von CST genutzt.

2.1.7 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Apra Bioscience GmbH (Freiburg) hergestellt.

Sequenzen:

BsrGI-CSTa-fw:

5'-CTA TTG TAC AAT GAA AAA ATA TAA AAA TAA TTG TAT ATC-3'

KpnI-CSTa-rev:

5'-GAT TGG TAC CGA TCT ATT AAT GTT CGA TCA ACA ATT AG-3'

Acc65I-CSTb-fw:

5'-CTG GGG TAC CAT GAA CAA AAA AAT ATT AGG TC-3'

KpnI-CSTb-rev:

5'-CTT AGG TAC CGA TTA ATG CTA AGT ACT AAT AAT TC-3'

CSTb-Seq1016-fw:

5'-CAG CTG GAG TAG CAA TTA ATA-3'

zur Sequenzierung der Sequenz für CSTb ab dem Basenpaar 1016

2.1.8 Enzyme

DNA-Polymerase

Phusion DNA Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach)

DNA-Ligase

T4 DNA Ligase (Fermentas, St.Leon-Rot, New England Biolabs, Schwalbach)

Restriktionsendonukleasen

BsrGI, KpnI, Acc65I, SpeI FD, XhoI FD (Fermentas, St.Leon-Rot, New England Biolabs, Schwalbach)

Phosphatase

Antarktische Phosphatase (New England Biolabs, Schwalbach)

Trypsin und Trypsin-Inhibitor

Trypsin und Trypsininhibitor (Sigma, Taufkirchen)

2.1.9 DNA-Marker

GeneRuler 1 kB DNA Ladder (Fermentas, St.Leon-Rot)

0,25 – 0.5 – 0.75 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 – 4 – 5 – 6 – 8 – 10 kb

2.1.10 Protein-Marker

peqGOLD Protein-Marker II (Peqlab, Erlangen)

10 – 15 – 20 – 25 – 30 – 40 – 50 – 60 – 70 – 85 – 100 – 120 – 150 - 200 kDa

peqGOLD Protein-Marker III (Peqlab, Erlangen)

20 – 25 – 35 – 50 – 85 – 120 kDa

2.1.11 Antikörper und Antiseren

primäre Antikörper:

LSR (X-25), sc-133765, rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology)

sekundäre Antikörper:

Alexa Fluor488 goat anti-rabbit Ig G (H+L) (Invitrogen)

2.1.12 Kits

- Phusion High-Fidelity PCR Kit (New England Biolabs, Schwalbach)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden)
- Roti-Prep Plasmid MINI Kit (Roth, Karlsruhe)

2.1.13 Radionukleotide

[³²P]α-NAD⁺ (Perkin Elmer, Rodgau)

2.1.14 Puffer und Lösungen

- 6x Lämmli-Puffer: 0,25% (*m/v*) Bromphenolblau, 40% Glycerol, SDS, β-Mercaptoethanol in dH₂O
- 1x PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, (pH 7,4)

MATERIALIEN UND METHODEN

- SDS-Probenpuffer (5x): 0,01% (m/v) Bromphenolblau, 125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,1 mM DTT, 10% (m/v) SDS, 29% (m/v) Glycerol
- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl (pH 8,3), 192 mM Glycin, 0,1% (m/v) SDS
- 1xTAE-Laufpuffer: 40 mM Tris-Acetat (pH 8), 1 mM EDTA

B. megaterium Transformation:

- CR5-Topagar (500 ml, besteht aus 3 Komponenten):
Komponente A: 51,5 g Saccharose, 3,25 g MOPS und 0,33 g NaOH, Auffüllung mit dH₂O auf 250 ml, pH 7,3 (NaOH)
Komponente B: 2 g Agar, 0,1 g Casaminosäuren (BD, Franklin Lakes, USA) und 5 g Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe) auf 142,5 ml dH₂O
Komponente C: 57,5 ml 8xCR5-Salze, 25 ml 12% (m/v) Prolin, 25 ml 20% (m/v) Glucose
8xCR5-Salze: 1,25 g K₂SO₄, 50 g MgCl₂·6H₂O, 0,25 g KH₂PO₄ und 11 g CaCl₂·2H₂O in 625 ml destilliertem Wasser
- PEG-P: 40% PEG 6000 in ein Volumen 1x SMM
- SMMP: 2xAB3 und 2xSMM 1:1
- 2xAB3: (Difco, Augsburg, Deutschland): 7 g in 200 ml H₂O
- 2xSMM: 1 M Saccharose, 40 mM Na-Maleat, 40 mM MgCl₂ (pH 6,5)

2.1.15 Sonstige Biochemikalien und Materialien

- Agarose (Sigma, Taufkirchen)
- Bio-Spin-Chromatographie Säulen (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californien, USA)
- Bradford-Reagenz (5x): 0,035% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 25% (v/v)
- BSA-Standard (2 mg/ml) (Uptima, Montluçon, Frankreich)
- Crystal Violet (Sigma, Taufkirchen)
- Mikroskopiedeckgläser (Zitt Thoma GmbH, Freiburg)
- dNTPs (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)

- Eppendorf-Tubes (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Ethanol, 50% (v/v) H₃PO₄, 25% H₂O
- Micro-Bio-Spin 6 Säulen (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californien, USA)
- Ni-IDA-Beads (Macherey-Nagel, Düren)
- Objektträger (Roth, Karlsruhe)
- PD-10 Umpufferungssäulen (GE Healthcare, München)
- Phalloidin-TRITC (Sigma, Taufkirchen)
- Protease Inhibitor Cocktail Complete (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)
- RedSafe (iNtRON Biotechnology, Seongnam-Si, Südkorea)
- TRITC-Phalloidin (50 µg/ml) (Invitrogen, Karlsruhe)
- Triton X-100 (Sigma, Taufkirchen)
- Tween20 (Sigma, Taufkirchen)
- Xylose (AppliChem, Darmstadt)

2.1.16 Geräte

- Axiovert 200M (Zeiss, Jena) mit CoolSNAP-HQ2 Digitalkamera (Roper Scientific, Plane)
- Axiovert 25 mit AxioCam Hrc (Zeiss, Jena)
- BIO-RAD, ChemiDoc XR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- BIO-RAD PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- BIO-RAD PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- BIO-RAD Universal Hood II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- CyFlow Space (Partec, Münster)
- Eagle Eye (Bachofer, Reutlingen)
- eppendorf vapo.protect (Eppendorf, Hamburg)
- Heidolph Instruments Duomax 1030 (Heidolph Instruments, Schwabach)
- Heraeus BB-16 (Heraeus Instruments, Hanau)
- Heraeus Fresco 21 centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold)

- Heraeus kelvitron t (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold)
- Heraeus Multifuge 1S-R centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold)
- Heraeus Multifuge 1.0 (Thermo Fischer Scientific, Langenselbold)
- Heraeus Pico 17 centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold)
- Innova 4330 (Eppendorf, Hamburg)
- Labor-Brand Drehrad Model L28 (Labor-Brand, Gießen)
- Microfluidics M-110P, Microfluidics (Newton, Massachusetts, USA)
- NanoDrop ND-1000 (Pepqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- TECAN infinite M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz)
- Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
- Ultraspec 1000 (Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz; heute: Pharmacia AG, Dübendorf, Schweiz)
- Ultraspec 2100 pro (Amersham Biosciences, GE Healthcare, München)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)
- BIO-RAD, Gel Dryer, Model 583

2.1.17 Computerprogramme

- GENTle

2.1.18 Dienstleister

- GATC-Biotech AG (Konstanz), DNA-Sequenzierung
- Apra Bioscience GmbH (Denzlingen), Synthese der Primer

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit DNA

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*)

Prinzip:

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifizierung von DNA.

Bei der PCR werden drei Schritte, Auftrennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge (Denaturierung), Anlagerung der Primer (Annealing) und Neubildung von DNA (Polymerisierung) zyklisch wiederholt. Ein PCR-Ansatz besteht aus DNA, aus Primern welche den zu amplifizierenden Genabschnitt flankieren, aus Desoxynukleotiden als „Bausteine“, einer hitzestabilen DNA-Polymerase, welche die Polymerisierung der Desoxynukleotide katalysiert und aus Reaktionspuffer.

Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge kommt es zur Anlagerung von synthetischen Oligonukleotiden (Primern) an die Enden des zu amplifizierenden Genbereichs. Ausgehend von den Primern kommt es zur Neubildung der doppelsträngigen DNA.

Mit jedem Durchlauf wird die DNA zwischen den beiden Primern verdoppelt, was zur exponentiellen Amplifizierung des DNA-Abschnitts führt.

Durchführung:

unter Beteiligung von Daniel Hornuss, s. Anhang

In dieser Arbeit wurde als Polymerase die Phusion DNA Polymerase und der zugehörige Phusion GC Puffer (NEB, Schwalbach) verwendet. Die Primer wurden von der Apra Bioscience GmbH (Denzlingen) hergestellt.

Die PCR wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und für den PCR-Ansatz wurden 225 ng Ausgangs-DNA verwendet.

Die PCR wurde mit der Denaturierung der Doppelstränge bei einer Temperatur von 98°C für 60 sec gestartet.

Es folgen anschließend 30 identische Zyklen für Denaturierung, Annealing und Polymerisierung: Denaturierung bei 98°C für 10 sec, Annealing bei 50°C für 15

sec, Elongation bei 72°C (T-Optimum Polymerase). Die Dauer der Elongation wurde entsprechend der Anzahl der zu amplifizierenden Basenpaare gewählt (Phusion: 1000 bp/15 sec). Der letzte Schritt fand bei 72°C für 10 min statt.

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Prinzip:

Zur Sichtbarmachung von DNA, um zum Beispiel zu prüfen, ob eine PCR erfolgreich war, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Agarose-Gelelektrophorese beruht auf der Beweglichkeit geladener DNA-Moleküle im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA ist zum einen von der Größe, zum anderen von der Konformation abhängig. Dem Agarosegel wird ein fluoreszierender Farbstoff zugegeben, welcher mit der DNA interkaliert. Auf diese Weise kann die DNA mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden. Nach dem Pipettieren der DNA in vorgefertigten Geltaschen, wird das Gel an eine Stromquelle angeschlossen. Die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle wandern dann durch die Gelmatrix, welche mit Laufpuffer getränkt ist, zur Anode.

Durchführung:

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde in dieser Arbeit RedSafe der Firma iNtRON Biotechnology (Seongnam-Si, Südkorea) gewählt. Die DNA wurde unter UV-Bestrahlung (ChemiDoc XR, Biorad) bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht. Die PCR-Banden wurden mit Gel-Banden bekannter Größe einer DNA-Leiter (GeneRuler 1 kB DNA Ladder, Fermentas, St.Leon-Rot) verglichen.

MATERIALIEN UND METHODEN

Zur Gelherstellung wurden 50 ml Agarose 0,8 % + 1,2 µl RedSafe verwendet. Als Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet. Die Auftrennung erfolgte für 30 min bei 100 Volt.

Laufpuffer:

1xTAE: 40 mM Tris-Acetat (pH 8), 1 mM EDTA

2.2.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet.

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) eingesetzt.

2.2.1.3.1 QIAquick PCR Purification Kit

Mit der Aufreinigung ist es möglich unerwünschte Bestandteile der PCR-Reaktion wie z.B. Primer, Nukleotide und DNA-Polymerasen zu entfernen.

Die Aufreinigung wurde entsprechend den Herstelleranweisungen durchgeführt. Dazu wurden die PCR-Ansätze 1 : 5 mit PB-Puffer verdünnt und anschließend auf entsprechende Säulchen gegeben, welche eine Silikat-Membran zur DNA-Bindung enthalten. Die Ansätze wurden kurz stehengelassen und dann für 60 sec bei 17 900 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Ansätze als Nächstes mit 0,75 ml ethanolhaltigem PE-Puffer gewaschen und zum Trocknen weitere 60 sec zentrifugiert. Die DNA wurde schließlich mit 30 µl EB-Puffer und Zentrifugation bei 17 900 x g für 1-2 min eluiert.

Puffer:

EB-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,5)

Die Zusammensetzung der anderen Puffer wird vom Hersteller nicht angegeben.

Vor Gebrauch wurde dem PB-Puffer 100% (v/v) EtOH zugegeben.

2.2.1.3.2 Extraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

Als Erstes wurde die durch UV-Bestrahlung sichtbar gemachte DNA mit einem Skalpel aus dem Gel herausgeschnitten und das Gewicht des Agarosegelstückchens bestimmt. Pro Gramm Gel wurden drei Milliliter QG-Puffer hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 50°C. Nachdem das Agarosegel in Lösung war, hatte der Ansatz eine gelbe Farbe, was für einen pH von <7,5 spricht; die Bindung der DNA an die QIAquick Membran ist nur effizient bei diesem pH (Puffer enthält pH-Indikator).

Die Lösung wurde anschließend 1:1 (Gel : Isopropanol) mit Isopropanol ergänzt. Dieser Schritt erhöht die Ausbeute von DNA-Fragmenten, welche weniger als 500 Basenpaare und mehr als 4 kb besitzen.

Die Ansätze wurden anschließend auf ein QIAquick-Säulchen zur DNA-Bindung gegeben und anschließend für eine Minute bei 17 900 x g zentrifugiert. Als Nächstes wurden 0,5 ml QG-Puffer zum Säulchen hinzugegeben; dieser Schritt ermöglicht die Entfernung von Agarose-Resten. Es folgte ein Waschschrift mit 0,75 ml PE-Puffer und anschließender Zentrifugation für eine Minute bei 10 000 x g, um Restethanol zu entfernen. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurde erneut für eine Minute bei 17 900 x g zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren wurde steriles, destilliertes Wasser auf die Säulchen gegeben, der Ansatz 2-3 min stengelassen und das Säulchen anschließend eine Minute bei 17 900 x g zentrifugiert.

Puffer:

Die Zusammensetzung der Puffer wird vom Hersteller nicht angegeben.

Vor Gebrauch wurde dem PE-Puffer 100% (v/v) EtOH zugegeben.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels UV-Photometrie

Im Fall von Nukleinsäuren wird die Extinktion einer DNA-Lösung bei 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml DNA.

In dieser Arbeit wurde zur photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration der NanoDrop (ND-1000 PEQLAB Biotechnologie GmbH) verwendet.

2.2.1.5 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Analytische und präparative Restriktionsansätze von DNA wurden in dieser Arbeit mit Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas (St.Leon-Rot) und der Firma New England Biolabs (Schwalbach) durchgeführt.

Für die Ligation wurden die aus dem Agarosegel aufgereinigten PCR-Produkte von CSTb am 5'-Ende mit *Acc65I* und am 3'-Ende mit *Bsr65I* geschnitten. Die PCR-Produkte von CSTa wurden am 5'-Ende mit *Bsr65I* und am 3'-Ende mit *KpnI* geschnitten. Der Expressionsvektor pHis1522 wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *Bsr65I* geschnitten. Die Restriktion erfolgte bei 37°C über Nacht. Es wurden die von den Herstellern für die Restriktionsendonukleasen optimierten Puffer verwendet.

Für den analytischen Verdau wurden in dieser Arbeit die Restriktionsendonukleasen *SpeI* und *XhoI* verwendet.

2.2.1.6 Vektor- Dephosphorylierung

Vor der Ligation wurde der pHis1522-Vektor dephosphoryliert, um die Selbstligation zu verhindern und somit die Ligation des PCR-Produkts in den Expressionsvektor zu verbessern. Bei einem 40 µl-Ansatz wurden ca. 1000 ng Vektor, 4 µl Puffer und 1 µl Phosphatase verwendet. Die Dephosphorylierung fand bei 37°C für eine Stunde statt und die Phosphatase wurde anschließend bei 65°C für 20 min deaktiviert.

In dieser Arbeit wurde die Antarktische Phosphatase und entsprechender Puffer von New England Biolabs verwendet.

2.2.1.7 Ligation

unter Beteiligung von Daniel Hornuss, s. Anhang

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in einen Expressionsvektor wurde die T4 DNA Ligase (Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Die T4 DNA Ligase katalysiert die Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Strängen. Als Puffer wurde T4 DNA Ligasepuffer verwendet.

Für die Ligation wurde in dieser Arbeit ein Vektor : Insert-Verhältnis zwischen 1 : 1 und 1: 3 gewählt. Es wurden standardmäßig 30 ng Vektor und 1 µl T4 DNA Ligase verwendet. Die Inkubation fand bei 22°C für eine Stunde statt. Die anschließende Hitzeinaktivierung der Ligase fand bei einer Temperatur von 65°C für 2 min statt.

Als Expressionsvektor wurde in dieser Arbeit der pHis1522-Vektor (MoBiTec, Göttingen, Abb. 4) gewählt.

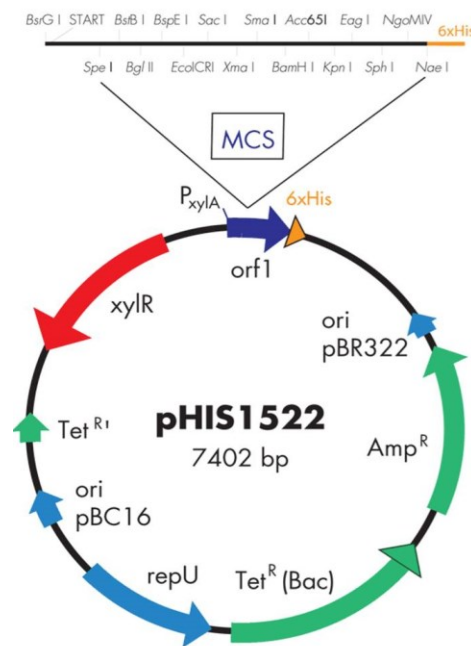


Abb 4. pHis1522-Vektor

entnommen aus [www. mobitec.de](http://www.mobitec.de) TetR(Bac):Tetrazyklin-Resistenz Bacillus; TetR: Tetrazyklin-Resistenz, unvollständig und inaktiv, AmpR: Ampicillin-Resistenz E.coli.; xylR: Xylose-abhängiger Repressor; ofr1: open reading frame unter Kontrolle der Xylose- induzierbaren Promotors PxylA; PxylA: xylA-Promoter; MCS: multiple cloning site; pBC16ori: Bacillus Replikations-Ursprung; pBR322, (ColE1) Replikationsursprung; repU: essentielles Gen zur Plasmidreplikation; ofr1: open reading frame 1(offenes Leseraster)

2.2.1.8 Herstellung kompetenter *E. coli* mit der Calcium-Chlorid-Methode

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien werden diese mit einer eiskalten Calciumchloridlösung behandelt. Die positiv geladenen Calciumionen alterieren die Zellwand (und die Zellmembran) der Bakterien und erzeugen kleine Löcher, die den Durchtritt der DNA-Moleküle erlauben.

2.2.1.9 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*

In dieser Arbeit wurde für die Amplifizierung von Plasmid-DNA der *E. coli*-Stamm XL1-Blue (Stratagene, LaJolla, USA) verwendet.

Zu je 500 µl DNA-kompetenten *E. coli* wurde 10 µl vom Ligationsansatz hinzugefügt und der Ansatz vorsichtig gemischt. Die Ansätze wurden

30 min auf Eis belassen und anschließend für 90 sec einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Nachdem die Bakterien erneut für 2 min auf Eis gestellt wurden, wurde dem Ansatz 1 ml Nährmedium (SOC-Medium) hinzugegeben

und es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C. Die Ansätze wurden als Nächstes für eine Minute bei 7 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das gelöste Bakterienpellet auf einer Selektivplatte, in diesem Fall auf einer LB-Ampicillin-Platte, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.10 Aufreinigung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Roti-Prep Plasmid MINI Kit (Roth) verwendet.

Nach der Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurden Klone der Selektivplatte gepickt und die Bakterien in 5 ml Flüssig-LB-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Bakterien aus der Übernacht-Kultur wurden durch Zentrifugation bei 8 000 x g und Raumtemperatur geerntet und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl RNase haltigem Resuspensionspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 250 µl Lysepuffer und vorsichtiges Mischen lysiert. Um geeignete Bedingungen für die Bindung der DNA an die Silikat-Säulchen zu gewährleisten, wurde 350 µl Neutralisationspuffer hinzugegeben und umgehend gemischt. Der folgende Zentrifugationsschritt fand bei 15 000 x g für 10 min bei Raumtemperatur statt. Als Nächstes wurde der Überstand in entsprechende Zentrifugationssäulchen pipettiert und erneut zentrifugiert (10 900 x g für 30 sec bei Raumtemperatur). Der Durchfluss wurde verworfen und das Säulchen durch Zugabe von 750 µl Waschpuffer und Zentrifugation (10 000 x g, 2 min/RT) gewaschen, der Durchfluss erneut verworfen und das Säulchen leer zentrifugiert (10 000 x g, 30 sec/RT), um restliches Ethanol zu entfernen. Die DNA wurde schließlich mit Elutionspuffer oder sterilem, destilliertem Wasser eluiert, und ihre Konzentration anschließend photometrisch bestimmt.

2.2.1.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten wurde in dieser Arbeit im Auftrag durch die Firma GATC-Biotech (Konstanz) durchgeführt.

2.2.1.12 Transformation von Plasmid-DNA in *B. megaterium*-Protoplasten

Nach Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde diese in *B. megaterium*-Protoplasten transformiert. Zu 500 µl Protoplasten wurden 5 µg Plasmid-DNA gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und zurück auf Eis gestellt. Anschließend wurde 1,5 ml PEG-P-Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min wurden 5 ml SMMP-Lösung hinzugegeben und es wurde vorsichtig gemischt. Anschließend wurde bei RT und 1300 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden dann 500 µl SMMP-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde durch Rollbewegungen vorsichtig durchmischt und anschließend unter leichtem Schütteln bei 37°C für 90 min inkubiert. Als Nächstes wurden 2,5 ml CR5-Topagar in einem Wasserbad (45°C) bis zur Verflüssigung erwärmt und schließlich der Transformationsansatz mit dem verflüssigten Topagar vermischt. Der Ansatz wurde dann auf eine LB-Selektionsmedium-Agarplatte gegeben und für 24 bis 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden dann innerhalb von zwei Tagen auf eine neue LB-Selektionsmedium-Agarplatte umgestrichen.

2.2.1.13 Aufreinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab

Aufgrund ihrer höheren Reinheit wurde zur Transformation von Plasmid-DNA in *Bacillus megaterium*, Plasmid-DNA verwendet, welche mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) aufgereinigt wurde.

Nach der Zellernte der Bakterienkultur (100 ml für *low-copy*-Plasmide) wurde das Zellpellet in 4 ml P1-Puffer resuspendiert. Dem Puffer wurde zuvor RNase beigefügt. Als Nächstes wurden 4 ml Puffer P2 hinzugegeben und die Lösung durch 4-6 maliges vorsichtiges Überkopfschwenken gemischt. Auf Vortexen wurde verzichtet, um die DNA nicht zu beschädigen. Es folgte eine Inkubation bei RT für 5 min. Nach Zugabe von 4 ml gekühltem Puffer P3 und vorsichtigem Schwenken, folgte eine Inkubation für 15 min auf Eis. Bei diesem Schritt entsteht ein weißliches Präzipitat, welches genomische DNA, Proteine, Zelldebris und SDS enthält. Nach einem Zentrifugationsschritt für 30 min bei 20 000 x g und 4°C, wurde der Überstand abpipettiert, welcher die DNA enthält. Dieser wurde dann erneut für 15 min zentrifugiert und erneut abpipettiert. Spezielle QIAGEN Säulchen wurden durch Zugabe von 4 ml Puffer QBT äquilibriert und anschließend mit der Plasmid-Lösung beladen. Nachdem die Plasmid-Lösung in den Filter des Säulchens eingesogen war, folgten zwei

MATERIALIEN UND METHODEN

Waschschritte mit 10 ml Puffer QC. Es folgte dann die Elution der DNA mit 5 ml Puffer QF. Um DNA auszufällen wurde 3,5 ml Isopropanol zur eluierten DNA hinzugegeben, gemischt und anschließend bei 15 000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das DNA-Pellet mit 2 ml 70% (v/v) EtOH gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 15 000 x g für 10 min wurde der Überstand vorsichtig entfernt, ohne das Pellet zu beschädigen. Nach 10-minütiger Inkubation zur Verdunstung der Restflüssigkeit wurde die DNA in 200 µl sterilem, destilliertem Wasser eluiert.

Puffer:

EB-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,5)

Die Zusammensetzung der anderen Puffer wird vom Hersteller nicht angegeben.

2.2.1.14 Herstellen von Glycerolstocks

Zu 750 µl Bakterienkultur wurden 750 µl 80% Glycerol hinzugegeben und es wurde durch Vortexen gemischt. Es folgte ein Kälteschock in Flüssigstickstoff und der Glycerolstock wurde anschließend bei -80°C weggefroren.

2.2.2 Arbeiten mit Proteinen

2.2.2.1 Proteinexpression im *Bacillus-megaterium*-Expression-System

Zur Proteinexpression wurde in dieser Arbeit das *Bacillus-megaterium*-Expression-System der Firma MoBiTec (Göttingen) verwendet.

Als Erstes erfolgte das Ansetzen einer Vorkultur: es wurden 50 ml 10x LB-Flüssigagar zu 450 ml sterilem Wasser gemischt und 500 µl Tetrazyklin (10mg/ml) zugegeben. Nachdem das Nährmedium mit Klonen des Glycerolstocks angeimpft wurde, folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Anschließend wurde die Hauptkultur angesetzt: mit je 100 ml Vorkultur wurde ein Liter Hauptkultur in einem 2l Kolben angeimpft und erneut bei 37°C über Nacht in einem Schüttler bebrütet. Die Bakterien-Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 bebrütet und anschließend durch Zugabe von 5% (m/v) Xylose die Proteinexpression induziert.

2.2.2.2 Isolierung von Proteinen aus *B. megaterium*-Lysaten mittels

Affinitätschromatographie

unter Beteiligung von Dr. Gregor Guttenberg, s. Anhang

Um die rekombinant hergestellten Toxine isolieren zu können, wurden diese mit einem Hexapeptid der Aminosäure Histidin fusioniert. Die DNA-Sequenz der Toxine wurde hierfür am C-Terminus um die Codons eines Histidin- Tags ergänzt (orf1. s. Abb.4).

Die Aufreinigung erfolgte dann über die Affinität von Ni^{2+} -Ionen zu Histidin. Während der Bindung wird ein stabiler Chelat-Komplex gebildet.

Die Elution erfolgte mit Hilfe von Imidazol, welches Histidin kompetitiv aus dem Komplex verdrängt.

Die Bakterien wurden nach der Proteinexpression und einer Übernacht-Inkubation mittels 15-minütiger Zentrifugation bei 7000 x g geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet auf Eis gehalten. Dann wurde das Bakterien-Pellet in je 3 ml Lysepuffer pro Gramm Pellet resuspendiert. Dem Lysepuffer wurde eine Protease-Inhibitoren-Mischung (Protease Inhibitor Cocktail Complete, Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) zugegeben. Die Resuspendierung des Pellets wurde bei 4°C im Kühlraum auf einem Magnetrührer durchgeführt. Die Zellyse erfolgte über einen dreimaligen Durchlauf der Bakterienlösung in einem Mikrofluidizer (M110P, Microfluidics, Newton, MA) bei 18 000 bis 20 000 psi. Das Zelldebris wurde nach erfolgter Lyse durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 18 000 x g entfernt.

Der Überstand wurde zu Ni-IDA-Beads (Macherey-Nagel, Düren, ca. 5 g Beads auf 50 ml Lysat) hinzugegeben und bei 4°C für eine Stunde auf einem Rotor inkubiert, um die Bindung der His-getaggtten Proteine zu ermöglichen.

Die Proteine wurden dann mittels der Batch-Methode aufgereinigt. Dazu wurde bei 400 x g für 3 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Den verbliebenen Ni-IDA-Beads mit den daran gebundenen Proteinen wurden 5 ml Lysepuffer zugegeben. Anschließend folgte eine Inkubation auf einem Rotor bei 4°C für 5 min. Es wurde erneut bei 400 x g für 3 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Der Waschschrift wurde vier Mal wiederholt. Schließlich wurde den Ni-IDA-Beads mit den daran gebundenen Proteinen imidazolhaltiger Puffer (Elutionspuffer) zugegeben und es wurde erneut bei 4°C auf einem Rotor für 15 min inkubiert um die Dissoziation der Proteine von den Nickel-Ionen zu

MATERIALIEN UND METHODEN

ermöglichen. Zum Schluss wurde bei 600 x g 5 min zentrifugiert und der Überstand mit den darin enthaltenden Proteinen vorsichtig abpipettiert.

Optional wurde das Imidazol aus den Proteineluaten mittels PD10-Entsalzungssäulchen (GE Healthcare, Freiburg) nach Angaben des Herstellers entfernt.

Verwendete Puffer:

Lyse-Puffer:	20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 500 µM EDTA, 10% Glycerol, pH 8 (+ 1 Tablette Complete auf 50 ml Puffer; Protease-Inhibitor-Mischung, Roche, Mannheim)
Elutionspuffer:	20 mM Tris-HCl (pH8), 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10% Glycerol

2.2.2.3 Umpuffern von Proteinlösungen mittels Entsalzungssäulen

Um aus Proteinlösungen eine bestimmte niedermolekulare Substanz zu entfernen, wurden Proteinlösungen in den gewünschten Puffer, ohne die entsprechende Substanz, mittels PD10 Desalting Columns umgepuffert.

Dazu wurden die Säulen zunächst durch fünfmaligen Durchlauf mit 5 ml Puffer äquilibriert. Die Proteinproben wurden dann auf 2,5 ml aufgefüllt und durch die Säule laufen gelassen. Schließlich wurden 3,5 ml Puffer auf die Säule gegeben und die durchgelaufene Proteinlösung aufgefangen.

In dieser Arbeit wurden die Entsalzungssäulen verwendet, um nach erfolgter Proteinaufreinigung das Imidazol aus der Lösung zu entfernen.

Verwendeter Puffer:

150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10% (w/v) Glycerol

2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Prinzip:

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Trennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse auf einer Polyacrylamidmatrix im elektrischen Feld.

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Makromolekülen im elektrischen Feld ist proportional zu ihrer Gesamtladung und ihrer Masse. Um den Einfluss der Eigenladung bei der Auftrennung der Proteine zu überdecken, werden Proteine mit SDS versetzt. SDS denaturiert Proteine und verhindert Protein-Protein-Wechselwirkungen. SDS bindet an Proteine und überdeckt durch die hohe negative Eigenladung die Ladung der Proteine. Da pro Masseneinheit Protein eine konstante Menge SDS gebunden wird, ist das Verhältnis von Ladung zu Masse proportional. Die Beweglichkeit der Proteine in der Gelmatrix ist dann nur noch von ihrer Größe abhängig.

In dieser Arbeit wurden 12,5% SDS- Gele verwendet.

Herstellung von SDS-Gelen:

Zusammensetzung Gele mit 12,5% Acrylamid:

Trenngel:

(12,5% Acrylamid) (10 ml): 4,17 ml Acrylamid-Lösung, 5,0 ml 0,75 M Tris/HCl (pH 8,8), 45 µl 20% (*m/v*) SDS, 100 µl 10% (*m/v*) TEMED, 40 µl 10% APS (*m/v*), 640 µl H₂O

Sammelgel:

(5% Acrylamid) (10 ml): 1,7 ml Acrylamid-Lösung, 2,0 ml 0,625 M Tris/HCl (pH 6,8), 50 µl 20% (*m/v*) SDS, 100 µl 10% (*m/v*) TEMED, 100 µl 10% APS (*m/v*), 6,05 ml H₂O

Als Erstes wurde die Gelkammer zusammengebaut und dann das Trenngel gegossen. Die Polymerisierung des Trenngels wurde durch die Zugabe von 100 µl TEMED eingeleitet und die Lösung mit einer Glaspipette zwischen die Glasplatten der Gelkammer pipettiert und anschließend mit 50%igem Isopropanol überschichtet.

Das über dem Trenngel befindliche Isopropanol wurde abdekantiert und verbliebene Alkoholreste wurden durch mehrmaliges Spülen mit H₂O entfernt.

MATERIALIEN UND METHODEN

Dann wurde das Sammelgel gegossen, die Sammelgellösung wurde über das Trenngel geschichtet und der Kamm (für 10 Probentaschen) eingesetzt.

Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE:

Die Proteinlösungen wurden mit 6xLämmli-Puffer gemischt (5 µl Puffer zu 30 µl Probe) und die Proteine 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Lämmli-Puffer besitzt neben β-Mercaptoethanol und SDS zusätzlich Bromphenolblau, welches im Gel an der Proteinfront wandert und somit den Verlauf der Elektrophorese anzeigt.

Die Proben und ein Proteinmarker (peqGold, Peqlab, Erlangen) wurden dann mit einer Hamilton-Spritze vorsichtig in die Taschen des SDS-Gels überführt.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA je Gel in SDS-Laufpuffer für 45 min.

Sichtbarmachung von Proteinen in SDS-Gelen durch Coomassie-Färbung:

Um die Proteine im SDS-Gel sichtbar zu machen, wurden diese mit Coomassie für 15 bis 30 min auf einer Wippe gefärbt. Zuvor wurden die Gele in der Coomassie-Lösung kurz erhitzt. Nach erfolgter Färbung wurden die Gele mit 10% (v/v) Eisessig behandelt, um den Coomassie-Farbstoff, welcher nicht an Proteine gebunden ist, zu entfernen. Dazu wurde die Färbelösung abgegossen, 10% (v/v) Eisessig zugegeben, kurz erhitzt und die Gele schließlich auf einer Wippe für mindestens drei Stunden entfärbt.

Material:

SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl (pH 8,3), 192 mM Glycin, 0,1% (m/v) SDS
Coomassie-Färbelösung:	0,025% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 0,025% (m/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% (v/v) Methanol, 9% (v/v) Eisessig
Entfärbelösung (1 l):	10% (v/v) Eisessig

2.2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Prinzip:

Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford reagieren die Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau, welcher an basische Aminosäuren bindet. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich hierbei hin zu 595 nm. Dann misst man die Absorption der unbekannten Probe bei dieser Wellenlänge. Die Bestimmung einer unbekannten Proteinlösung ist möglich, wenn man für die Eichung ein Protein verwendet, welches einen annähernd gleichen Gehalt an basischen Aminosäuren enthält. Als Standard für die Eichung hat sich Bovines Serumalbumin durchgesetzt.

Durchführung:

Ein definiertes Volumen der zu untersuchenden Proteinlösung wurde mit Bradford-Reagenz vermischt und BSA als Referenz (1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl) hinzugegeben und dann die Absorption gegen einen Leerwert (Bradford-Mischung ohne Protein) bei 595 nm gemessen.

Die Proteinkonzentration in der untersuchten Proteinlösung konnte anhand der BSA-Eichgerade abgelesen werden.

2.2.2.6 Identifizierung von Proteinen

Die aufgereinigten Toxine wurden in dieser Arbeit, nach erfolgter Aufreinigung, mittels SDS-Page aufgetrennt. Proteine, welche im Polyacrylamidgel auf der zu erwarteten Höhe liefen, wurden mittels MALDI-TOF identifiziert.

2.2.2.7 Aktin-Nach-ADP-Ribosylierung

Zellen wurden für verschiedene Zeitintervalle bei 37°C mit Toxin oder ausschließlich mit der Bindekomponente behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in eisgekühltem ADP-Ribosylierungspuffer gelöst. Die Lyse der Zellen wurde mittels 10maliger Passage durch eine 26-Gauge Kanüle vollzogen. Das Zelldebris wurde anschließend mittels Zentrifugation für 15 min bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 21 000 x g entfernt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels der Methode nach Bradford wurden die Zellextrakte einer *in vitro* Aktin-Nach-ADP-

MATERIALIEN UND METHODEN

Ribosylierung für eine Stunde bei 37°C unterzogen. C2I wurde dabei als Aktin-ADP-Ribosyltransferase und radioaktiv markiertes NAD als Cosubstrat verwendet (C2I modifiziert Aktin am selben Aminosäure-Rest wie CST). Pro Ansatz wurden 30 µg Protein eingesetzt. Nach erfolgter Aktin-Nach-ADP-Ribosylierung wurde die Reaktion durch Zugabe von 5xProbenpuffer bei 95°C gestoppt.

Verwendeter Puffer:

ADP-Ribosylierungspuffer: 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, (DTT), Complete Proteasehemmer-Mix, pH 7,5

2.2.2.8 Fluoreszenzfärbungen von Proteinen

2.2.2.8.1 Alexa- Labeling der aufgereinigten Proteine

Gemäß den Herstellerangaben wurde CSTb mit Alexa Fluor 488 und CDTb und C2I mit Alexa Fluor 568 fluoreszenzmarkiert. Die Bindekomponenten waren bereits proteolytisch aktiviert und wurden in unten genanntem Puffer umgepuffert. Hierzu wurden Micro-Bio-Spin 6 Säulen (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californien, USA) verwendet. Die Säulen wurden zunächst mit dem Puffer äquilibriert. Anschließend wurden die Proteinlösungen auf die Säulen gegeben. Das Eluat wurde nach Zentrifugation (4 min, 1000 x g, 4°C) in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Mit dem Eluat, welches die umgepufferte Proteinlösung enthält, fand die Alexa-Färbung statt. Hierzu wurde die Proteinlösung mit einem Aliquot Alexa-Farbstoff vermischt und bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 100 mM Tris-Lösung (pH 7,4) gestoppt.

Verwendeter Puffer:

0,1 M NaHCO₃, 10% Glycerol, 300 mM NaCl, pH 8

2.2.2.8.2 Immunolabeling von Proteinen in kultivierten Zellen

unter Beteiligung von Thilo Nölke und Dr. Carsten Schwan, s. Anhang

Nachdem CaCo2-Zellen für 48 bis 72 Stunden kultiviert, mit PBS gewaschen und mit 4% PFA in PBS fixiert wurden, folgte die Permeabilisierung mit 0,15% Triton X-100 für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde mit 1xPBS/ 0,05% Tween20/ 1% BSA für 30 min im Dunkeln, bei Raumtemperatur

MATERIALIEN UND METHODEN

geblockt. Es folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper (1:300) in 1xPBS/ 0,05% Tween20/ 1% BSA über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Zellen drei Mal für 5 min mit 1xPBS/ 0,05% Tween20 gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (1:200) in 1xPBS/ 0,05% Tween20/ 1% BSA hinzugegeben und die Antikörperfärbung für eine Stunde im Dunkeln und bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden dann drei Mal für 5 min mit 1xPBS/ 0,05% Tween20 gewaschen. Am Ende wurden die Zellen zuerst mit 70% (v/v), anschließend mit 100% (v/v) EtOH 1 Minute entwässert und schließlich an der Luft getrocknet. Die Zellen wurden zum Mikroskopieren eingedeckelt (Mowiol).

Antikörper:

primär: LSR (X-25), sc-133765, Hase (Santa Cruz Biotechnology, Californien, USA)
sekundär: Alexa 568- bzw. Alexa 488- konjugierter Anti-Hase-IgG aus der Ziege (Invitrogen, Californien, USA)

Fluoreszenzfärbungen von Proteinen in Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit für Kolokalisationsstudien durchgeführt, um die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von CST fluoreszenzmikroskopisch darstellen zu können und somit zu zeigen, dass die Toxinaufnahme LSR-abhängig ist.

Nachdem CaCo2-Zellen auf Deckgläschen kultiviert wurden, folgte die Antikörperfärbung des LSR. Anschließend wurden die CaCo2-Zellen mit 50 nM Alexa488-markiertem, aktiviertem CSTb zusammen mit 10 nM CSTa inkubiert. Zum Vergleich wurden CaCo2-Zellen auf dieselbe Weise mit CDT und mit *C. botulinum* C2-Toxin inkubiert. Die CaCo2-Zellen wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

2.2.3 Arbeiten mit Säugerzellen

2.2.3.1 Mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie

Die toxische Wirkung von clostridialen binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen auf Zellen, lässt sich u. a. an morphologischen Veränderungen der Zellen, wie z. B. Abrundung, erkennen. Da diese Veränderungen erst durch den

Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts infolge einer ADP-Ribosylierung zustande kommen, muss das Toxin in die Zelle hinein gelangen, um diese Wirkung zu entfalten. In dieser Arbeit wurde die toxische Wirkung von CST auf Zellen in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit vom LSR untersucht. Wäre die Aufnahme von CST LSR-abhängig, sollten in Abwesenheit von LSR auf der Zelloberfläche, nach Zugabe von CST keine Zellveränderungen zu sehen sein. Im Gegensatz dazu sollten diese Veränderungen auftreten, wenn für die Vergiftung Zellen verwendet werden, welche LSR in hoher Zahl exprimieren. Für die Vergiftung von Zellen mit CST wurden CaCo2-Zellen, die LSR auf ihrer Oberfläche exprimieren, verwendet. Zusätzlich wurden native H1-HeLa-Zellen, welche keine messbare Menge an LSR Protein exprimieren und resistent gegenüber CDT und Iota-Toxin sind, sowie LSR-transduzierte H1-HeLa-Zellen, welche LSR in hoher Zahl exprimieren, verwendet.

Die Morphologie der Zellen wurde in dieser Arbeit lichtmikroskopisch beurteilt.

2.2.3.2 Aktin-Zytoskelett-Fluoreszenzfärbung

unter Beteiligung von Thilo Nölke und Dr. Carsten Schwan, s. Anhang

CaCo2-Zellen wurden zunächst für zwei Tage auf Cover Slips (Deckgläser, Zitt Thoma GmbH) kultiviert. Das Kulturmedium wurde anschließend entfernt und die Zellen ein Mal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS. Zellen wurden dann für 10 min mit 1xPBS/ 0,15% Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurde für 30 min bei Raumtemperatur in 1% BSA/ 1xPBS/ 0,05% Tween20 geblockt. Das Aktin der Zellen wurde dann für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (1:200) in 1xPBS/ 0,05% Tween20/ 1% BSA gefärbt. Es folgten drei Waschschrte für 5 min mit 1xPBS/ 0,05% Tween20. Schließlich wurde für eine Minute mit 70% (v/v) EtOH und dann mit 100% (v/v) EtOH entwässert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur getrocknet und die Zellen zum Mikroskopieren eingedeckelt (Mowiol). Dazu wurden die Mikroskopierdeckgläschen auf 8-10 µl Eindeckelmedium, welches zuvor erhitzt wurde, auf Objektträger gelegt. Das Eindeckelmedium enthält DAPI, welches den Zellkern färbt.

Mowiol-Eindeckelmedium:

2g, Glycerol: 6 g, H₂O: 6ml, 0,2 M Tris-HCl (pH8,5): 12 ml, DAPI (10mg/ml)

2.2.3.3 Crystal-Blue-Assay

Zellen wurden im Kulturmedium mit ansteigenden Konzentrationen an Toxin bei 37°C über Nacht behandelt.

Das Kulturmedium wurde entfernt, die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und dann für 30 min bei 4°C mit 400 µl PFA/PBS fixiert. Als Nächstes wurden die Zellen mit je 400 µl 0,5 % Crystal Violet Lösung in 70 % (v/v) EtOH ebenfalls über 30 min bei 4°C gefärbt. Überschüssiges Färbemittel wurde durch dreimaliges Waschen mit Wasser entfernt und die Zellen anschließend bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

2.2.3.4 FACS-Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen sowie Peptiden und DNA. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird.

Grundlage einer FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) ist eine (gefärbte) Einzelzellsuspension (oder andere lösliche Partikel), wobei die Zellen dabei einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren. Das dabei erzeugte, charakteristische Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Mithilfe dieser Methode lassen sich relativ große Zellzahlen in vergleichsweise kurzer Zeit analysieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden FACS-Analysen durchgeführt, um die Bindung von CSTb-Alexa488 an LSR-exprimierende Zellen zu untersuchen.

Als Vorbereitung wurden zunächst adhärent wachsende Zellen mit 10 mM EDTA in PBS abgelöst und anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen. Es wurde dann jeweils fluoreszenzmarkiertes Protein zur Zellsuspension gegeben. Ein typischer Ansatz bestand aus 1 ml und enthielt 100000 H1-HeLa(+LSR) oder untransduzierte H1-HeLa-Zellen (in PBS) sowie 1-10 µg fluoreszenzmarkiertes CSTb.

Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit PBS gewaschen und am Durchflusszytometer (FACSCalibur) analysiert.

Als Kontrolle wurden beide Zelllinien außerdem unbehandelt belassen.

MATERIALIEN UND METHODEN

Da Zellen von sich aus nur wenig Eigenfluoreszenz emittieren, sollte auf Zellen, welche fluoreszenzmarkiertes CSTb gebunden haben, deutlich mehr Fluoreszenzemission gemessen werden können, als auf Zellen, welche kein fluoreszenzmarkiertes CSTb gebunden haben.

Zusätzlich wurden FACS-Analysen durchgeführt, die darauf abzielten, unspezifische Bindungen von CSTb-Alexa488 an H1-HeLa(+LSR)-Zellen auszuschließen. Dazu wurden Wettbewerbsversuche durchgeführt. Für die Wettbewerbsversuche wurden Zellen mit 50 µg aktiviertem, unmarkiertem CSTb oder mit 50 µg bovinem Serumalbumin (BSA) pro 1 Million Zellen in 0,5 ml PBS für 5 min auf Eis vorinkubiert. Dem Ansatz, welcher BSA enthielt, wurden zusätzlich dieselbe Menge an Trypsin und Trypsininhibitor, die auch bei der Aktivierung von CSTb verwendet wurden, zugegeben. Anschließend wurden beide Ansätze mit CSTb-Alexa488 inkubiert. Als Kontrolle wurden zudem nicht vorinkubierte Zellen mit CSTb-Alexa488 behandelt. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurde Zelloberflächen-gebundene Fluoreszenz mittels FACS detektiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Rekombinante Herstellung von CSTa und CSTb

Voraussetzung für diese Arbeit war die rekombinante Herstellung der beiden Toxinkomponenten CSTa und CSTb. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals durchgeführt. Die Methode wurde übernommen aus Protokollen für die rekombinante Herstellung von verschiedenen anderen clostridialen Toxinen (PAPATHEODOROU et al. 2010; GUTTENBERG et al. 2011; YANG et al. 2008; SCHWAN et al. 2011).

3.1.1 Amplifizierung der Genabschnitte aus genomischer DNA

Da lediglich die komplette genomische DNA von *C. spiroforme* als Ausgangsmaterial vorhanden war, wurden zunächst die für CSTa und CSTb codierenden Genabschnitte aus der genomischen DNA von *C. spiroforme* mittels PCR amplifiziert. Die Ausgangs-DNA stammte aus dem *C. spiroforme* Stamm CS 246.

Die PCR-Produkte wurden anschließend über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und UV-photometrisch sichtbar gemacht. Die korrekte Länge der PCR-Banden wurde anhand der Banden bekannter Größe einer DNA-Leiter (Gene Ruler 1kB DNA Ladder) verifiziert (s. Abb. 5).

Ergebnis (Abb. 5):

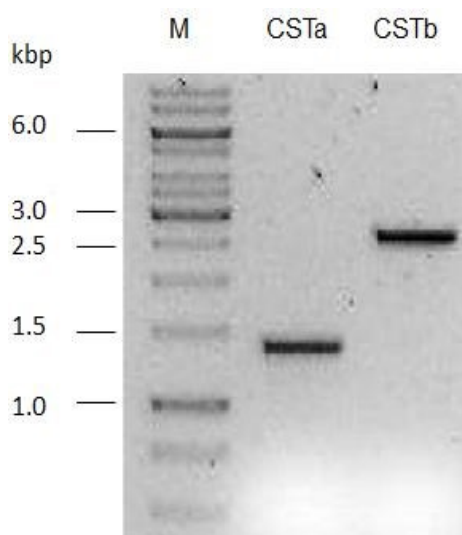


Abb. 5. Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produkte CSTa und CSTb. Die DNA-Sequenz der Enzymkomponente CSTa besitzt eine Größe von ca. 1400 bp, die der Bindekomponente CSTb eine Größe von ca. 2600 bp.

3.2.1 Expression von CSTa und CSTb in *B. megaterium*

Nachdem die erfolgreich amplifizierten PCR-Produkte im pHis 1522-Vektor in *B. megaterium*-Protoplasten transformiert worden waren, konnten die beiden Toxinkomponenten erfolgreich im *Bacillus-megaterium*-Expression-System exprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Proteinexpression gelang für CSTa bei 16°C und für CSTb bei 24°C über Nacht.

Ergebnis (Abb. 6):

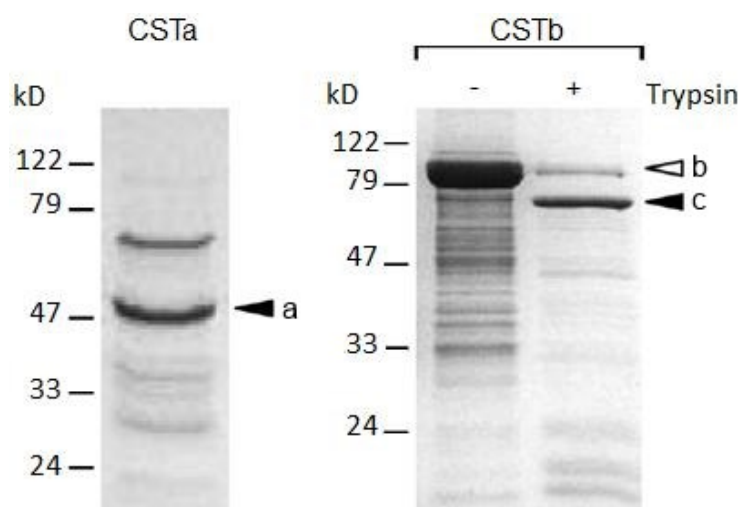


Abb. 6 SDS-Page der rekombinant hergestellten und aufgereinigten Toxinkomponenten CSTa, CSTb und aktiviertes CSTb. Die zu erwartenden Banden von CSTa, CSTb und vom aktivierten CSTb wurden mit Banden bekannter Größe eines Proteinmarkers verglichen. CSTa (a) besitzt ein Molekulargewicht von ca. 50 kD, CSTb von ca. 98 kD (b) und die mit Trypsin aktivierte Form ca. 75 kD (c).

3.2 Rekombinant hergestelltes CST ist funktionell und weist Aktin ADP-ribosylierende Eigenschaften auf

Nachdem die beiden Toxinkomponenten des *C. spiroforme*-Toxins erstmals rekombinant hergestellt wurden, musste überprüft werden, ob rekombinantes CST sich wie ein biologisch aktives Aktin-ADP-ribosylierendes Toxin verhält.

3.2.1 CST besitzt toxische Aktivität

Die mikroskopische Untersuchung von CaCo2-Zellen nach einer ÜN-Vergiftung mit CST zeigte, dass ausschließlich Zellen welche mit beiden Toxin-Komponenten behandelt wurden, morphologische Veränderungen wie Zellabrundung aufwiesen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die beiden Komponenten biologische Aktivität besitzen (s. Abb. 7).

Ergebnis (Abb 7):

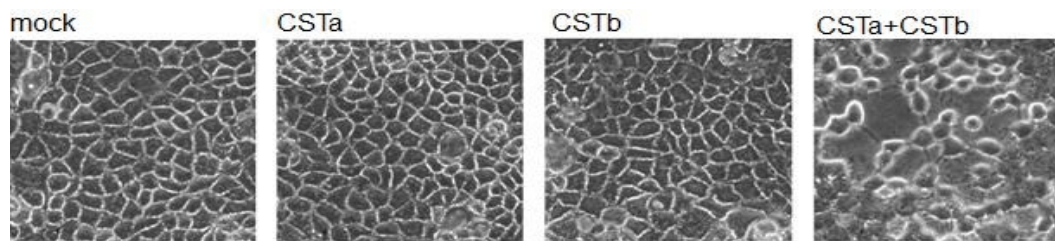


Abb. 7 ÜN-Vergiftung bei 37°C von CaCo2-Zellen mit je 10 nM CSTa und CSTb und CSTa+CSTb. Deutliche Zeichen von Zellabrundung, als Hinweis für eine Zellvergiftung, sind nur sichtbar bei Zellen, welche mit beiden Toxinkomponenten behandelt wurden.

3.2.2 Vergiftung von CaCo2-Zellen führt zum Kollaps des Aktin-Zytoskeletts

Nachdem CaCo2-Zellen mit CST inkubiert wurden, konnte mithilfe der Fluoreszenzfärbung des Aktin-Zytoskeletts bildlich gezeigt werden, dass die Behandlung von CaCo2-Zellen mit beiden Toxinkomponenten zum Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts führt (s. Abb. 8).

Ergebnis (Abb. 8):

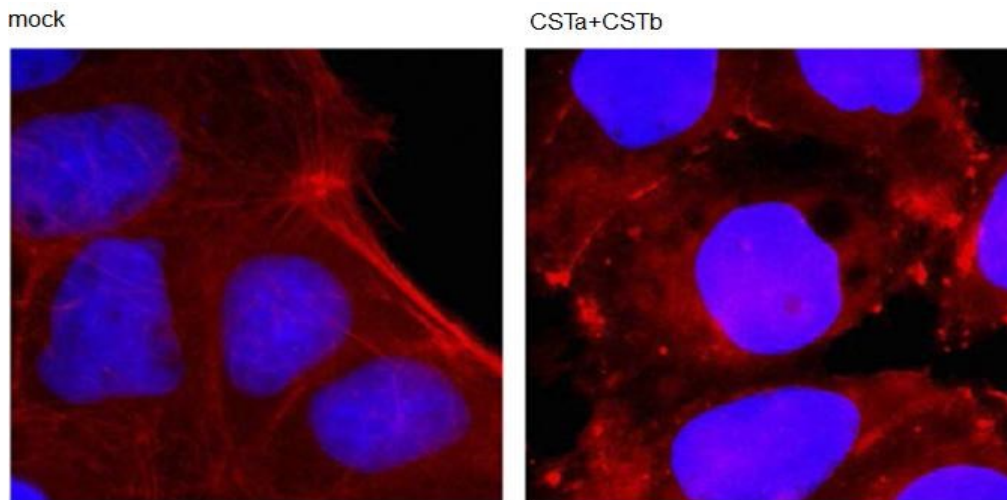


Abb. 8 Zusammenbruch des Aktin- Zytoskeletts nach CST- Vergiftung. TRITC-Phalloidin (rot, Aktin) und DAPI (blau, Zellkern) gefärbt. Mock: gefärbte Zellen, welche nicht mit Toxin behandelt wurden als Kontrolle. Depolymerisierung von Aktin-Filamenten war nur sichtbar in Zellen, welche mit je 10 nMToxin für 8 Stunden behandelt worden waren.

3.2.3 Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts ist Folge der Aktin-ADP-Ribosylierung durch rekombinantes CST

Der Aktin-Nach-ADP-Ribosylierungs-Assay zeigte, dass die Menge an Aktin, welches C2I zur *in vitro* Nach-ADP-Ribosylierung zur Verfügung stand, zeitlich proportional abnahm in CaCo2-Zellen, welche mit beiden CST-Komponenten behandelt worden waren. Die Menge an Aktin blieb unverändert in Zellen, welche lediglich mit der Bindekomponente CSTb behandelt worden waren. Die Menge an Aktin, welches durch C2I ribosyliert werden konnte, nahm zudem schneller ab, wenn die Konzentration von CST erhöht wurde.

Es konnte somit gezeigt werden, dass rekombinant hergestelltes CST Aktin-ADP-ribosylierende Eigenschaften besitzt (s. Abb. 9).

Ergebnis (Abb. 9):

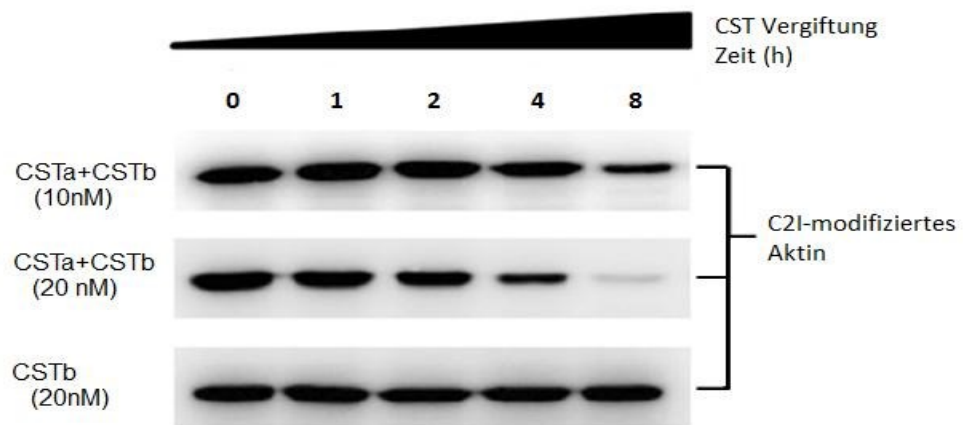


Abb. 9 SDS-PAGE von Nach-ADP-ribosyliertem Aktin. CaCo2-Zellen wurden für 0h, 1h, 2h, 4h und 8h mit je 10 nM oder 20 nM CSTa und CSTb oder mit lediglich 20 nM CSTb behandelt. Die Intensität der Banden korreliert mit der Menge an radioaktiv markiertem NAD. Je heller die Bande, desto weniger [^{32}P] α -NAD $^{+}$ konnte durch C2I auf Aktin übertragen werden.

3.3 LSR ist der Oberflächenrezeptor für CST

Der Lipolyse-stimulierte Lipoproteinrezeptor (LSR, engl. *lipolysis-stimulated lipoprotein receptor*) wurde als der Zellmembranrezeptor für CDT und Iota-Toxin, zweier Vertreter der Iota-Toxin-Familie der clostridialen, binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine, identifiziert. Da *C. spiroforme* Toxin ebenfalls zu dieser Gruppe gehört, sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob CST ebenfalls den LSR für den Zelleintritt nutzt.

3.3.1 Zellabrundung von H1-HeLa(+LSR)-Zellen durch CST-Vergiftung

Nachdem H1-HeLa(+LSR)-Zellen und native H1-HeLa-Zellen mit CSTa und CSTb oder lediglich mit CSTb behandelt wurden, konnte gezeigt werden, dass native H1-HeLa-Zellen nach der Behandlung mit rekombinantem CST keine morphologischen Veränderungen wie Zellabrundung zeigten. Lediglich LSR-transduzierte H1-HeLa-Zellen zeigten typische Vergiftungsmerkmale. Dies war ein Hinweis dafür, dass die Veränderungen der Zellmorphologie LSR-abhängig sind (s. Abb. 10).

Ergebnis (Abb. 10):

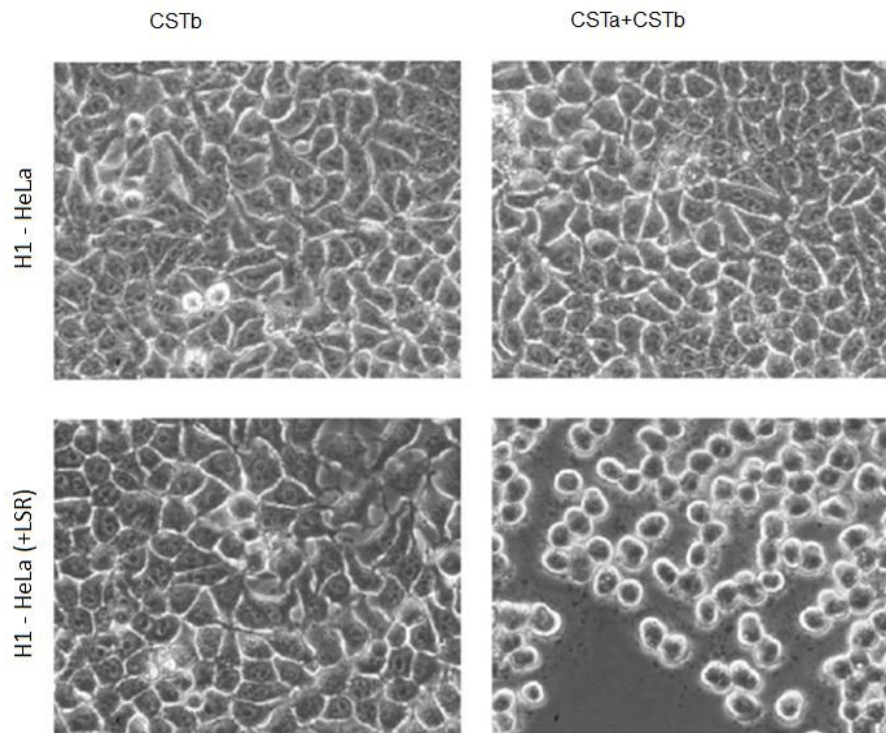


Abb. 10 ÜN-Vergiftung von H1-HeLa(+LSR)-Zellen und H1-Hela(-LSR)-Zellen mit rekombinantem CST. Zellen wurden mit je 10 nM CSTa und CSTb oder lediglich mit CSTb bei 37°C behandelt. Deutliche Zeichen von Vergiftung wie Zellabrundung und Ablösung von der Kulturplatte konnten nur bei den LSR-transduzierten Zellen beobachtet werden. Nicht transduzierte Zellen waren resistent gegenüber der Zugabe des Toxins. Als Kontrolle wurden Zellen lediglich mit der Bindekomponente behandelt.

3.3.2 Ablösung von H1-HeLa(+LSR)-Zellen nach CST-Vergiftung

Als weiteren Nachweis für die LSR-abhängige Vergiftung wurde ein Crystal-Blue-Assay durchgeführt. H1-HeLa-Zellen lösten sich nach Zugabe von CST nur dann von der Oberfläche ab, wenn sie LSR-transduziert waren. Zudem stieg die Zahl der abgelösten Zellen mit einer Erhöhung der Toxinkonzentration. Die Ergebnisse, welche mit dem Crystal-Blue-Assay erzielt wurden, waren ein weiterer Hinweis dafür, dass die Vergiftung von H1-HeLa-Zellen LSR abhängig ist (Abb. 11).

Ergebnis (Abb. 11):

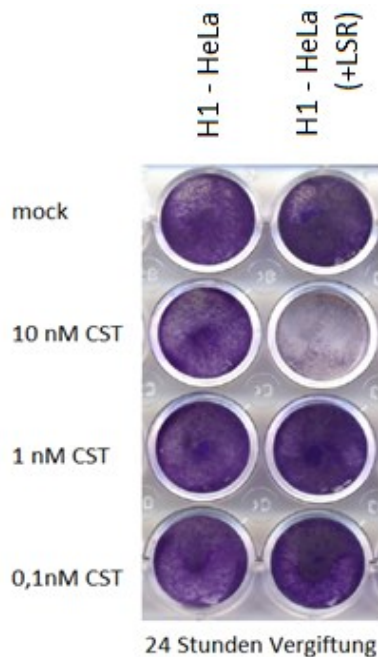


Abb. 11 Crystal-Blue-Assay mit H1-HeLa(+LSR)- und H1-HeLa(-LSR)-Zellen.

Jeweils 100 000 Zellen wurden mit 0,1 nM, 1 nM und 10 nM CST bei 37°C inkubiert und mit Crystal Violet gefärbt. Da vergiftete Zellen abrunden und sich somit von der Kulturplatte lösen, werden sie durch die Waschschriffe entfernt. Die Folge sind weniger adhärenente Zellen in den Wells, welche für die Färbung mit Crystal Violet zur Verfügung stehen. Eine dunklere Färbung der Wells spricht somit für mehr adhärenente Zellen und folglich für eine weniger starke Vergiftung. Mock: Zellen ohne Toxinzugabe.

3.3.3 Nach-ADP-Ribosylierung von Aktin aus H1-HeLa(+LSR)-Zellen

Die LSR-abhängige Vergiftung wurde weiter bestätigt durch den Stand der ADP-Ribosylierung von Aktin in Lysaten von H1-Hela-Zellen, welche mit CST vergiftet wurden. Der Aktin-Nach-ADP-Ribosylierungs-Assay konnte zeigen, dass lediglich das Aktin der H1-HeLa(+LSR)-Zellen, welche mit rekombinantem CST behandelt werden, ADP-ribosyliert wird. Das Aktin der H1-HeLa-Zellen bleibt nach erfolgter CST-Vergiftung unmodifiziert und kann bei der Nach-ADP-Ribosylierung durch C2I ADP-ribosyliert werden (s. Abb. 12).

Ergebnis (Abb 12):

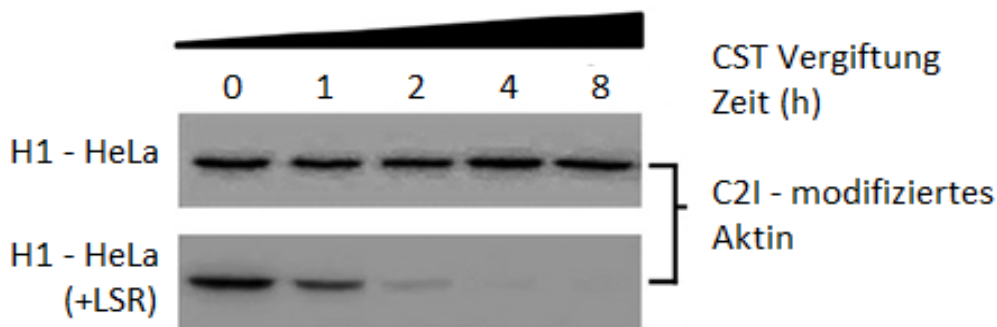


Abb. 12 SDS-PAGE. Aktin-Nach-ADP-Ribosylierung von H1-HeLa(+LSR)-Zellen und H1-HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden bei 37°C für 0h, 1h, 2h, 4h und 8h mit CST vergiftet. Die Intensität der Banden korreliert mit der Menge an NAD welches in der Nach-ADP-Ribosylierung durch C2I auf Aktin übertragen wurde. Weniger [³²P]α-NAD spricht somit für eine stärkere Vergiftung. Die Menge an Aktin, welche C2I zur Nach-ADP-Ribosylierung zur Verfügung steht, bleibt bei H1-HeLa-Zellen unverändert, während sie bei H1-HeLa(+LSR)-Zellen proportional zur Dauer der Vergiftung mit rekombinantem CST abnimmt.

3.3.4 Bindung von CSTb an H1-HeLa(+LSR)-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass die Vergiftung von H1-HeLa-Zellen mit CST LSR-abhängig ist, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Es konnte hiermit gezeigt werden, dass H1-HeLa(+LSR)-Zellen welche mit CSTb-Alexa488 inkubiert wurden, deutlich mehr Fluoreszenz emittieren als H1-HeLa-Zellen, die ebenfalls mit CSTb-Alexa488 inkubiert wurden. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis für die spezifische Bindung von CSTb an LSR (s. Abb. 13).

Ergebnis (Abb. 13):

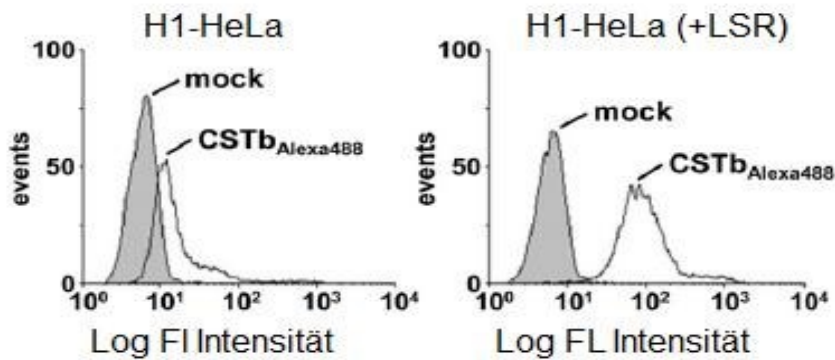


Abb. 13 Durchflusszytometrie. Auf der y-Achse wird die Anzahl der gemessenen Zellen, auf der x-Achse die Intensität der Fluoreszenz logarithmisch dargestellt. Graue Peaks repräsentieren die Fluoreszenz von H1-HeLa-Zellen ohne Zugabe von Protein (mock) und weiße Peaks die Fluoreszenz von H1-HeLa-Zellen, welche mit Fluoreszenz-gelabeltem CSTb (CSTb-Alexa488) inkubiert wurden. Die gemessene Fluoreszenz ist deutlich höher in Zellen welche LSR in hoher Zahl exprimieren.

3.3.5 Bindung von CSTb-Alexa488 an LSR

Mithilfe von FACS-Analysen wurde in Wettbewerbsversuchen mit bovinem Serumalbumin und ungelabeltem CSTb gezeigt, dass H1-HeLa(+LSR)-Zellen, welche bereits mit unmarkiertem CSTb behandelt wurden, nahezu kein CSTb-Alexa488 binden können, was an der geringen Fluoreszenzemission der H1-HeLa(+LSR)-Zellen deutlich wird. H1-HeLa(+LSR)-Zellen welche mit bovinem Serumalbumin vorinkubiert wurden, zeigten dieselbe Fluoreszenzemission, wie Zellen die lediglich mit CSTb-Alexa488 behandelt waren.

Dies deutet auf eine spezifische Bindung von CSTb an LSR hin (s. Abb. 14).

Ergebnis (Abb. 14)

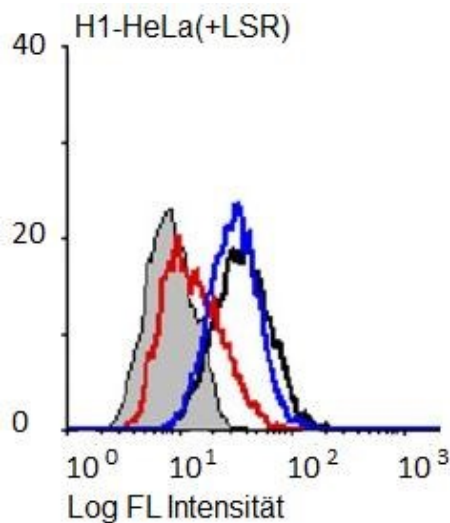


Abb.14 Wettbewerbsversuche. Auf der y-Achse wird die Anzahl an Zellen, auf der x-Achse die Intensität der Fluoreszenz dargestellt. Grauer Peak repräsentiert H1-HeLa(+LSR)-Zellen welche ohne Präinkubation und ohne Zugabe von CSTb-Alexa488 belassen wurden (mock). Roter Peak: H1-HeLa(+LSR)-Zellen zunächst mit CSTb und anschließend mit CSTb-Alexa488 inkubiert. Blauer Peak: H1-HeLa(+LSR)-Zellen zunächst mit BSA und anschließend mit CSTb-Alexa488 inkubiert. Schwarzer Peak: H1-HeLa(+LSR)-Zellen nur mit CSTb-Alexa488 inkubiert. H1-HeLa(+LSR)-Zellen welche zunächst mit aktiviertem CSTb und anschließend mit CSTb-Alexa488 inkubiert wurden, zeigten deutlich weniger Fluoreszenzemission als H1-HeLa-Zellen welche mit BSA inkubiert oder unbehandelt belassen wurden, bevor sie mit CSTb-Alexa488 inkubiert wurden.

3.3.6 Kolokalisation von CST und LSR in endozytischen Vesikeln

Der Vergleich der Fluoreszenzsignale von CSTb mit Signalen von endogenem, Antikörper-gefärbtem LSR mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie, bestätigten die Kolokalisation beider Proteine in endozytischen Vesikeln. Ein ähnliches Kolokalisationsbild wurde beobachtet, wenn Alexa-gelabeltes CDT als Positivkontrolle verwendet wurde. *C. botulinum* C2-Toxin zeigte keine Kolokalisation mit den LSR-enhaltenden Vesikeln (Abb. 15).

Demnach nutzen clostridiale binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine, welche zur Iota-Toxin-Familie gehören, den LSR für den Zelleintritt und *C. botulinum* C2-Toxin, als Vertreter der C2-Toxin-Familie, nicht.

Ergebnis (Abb. 15):

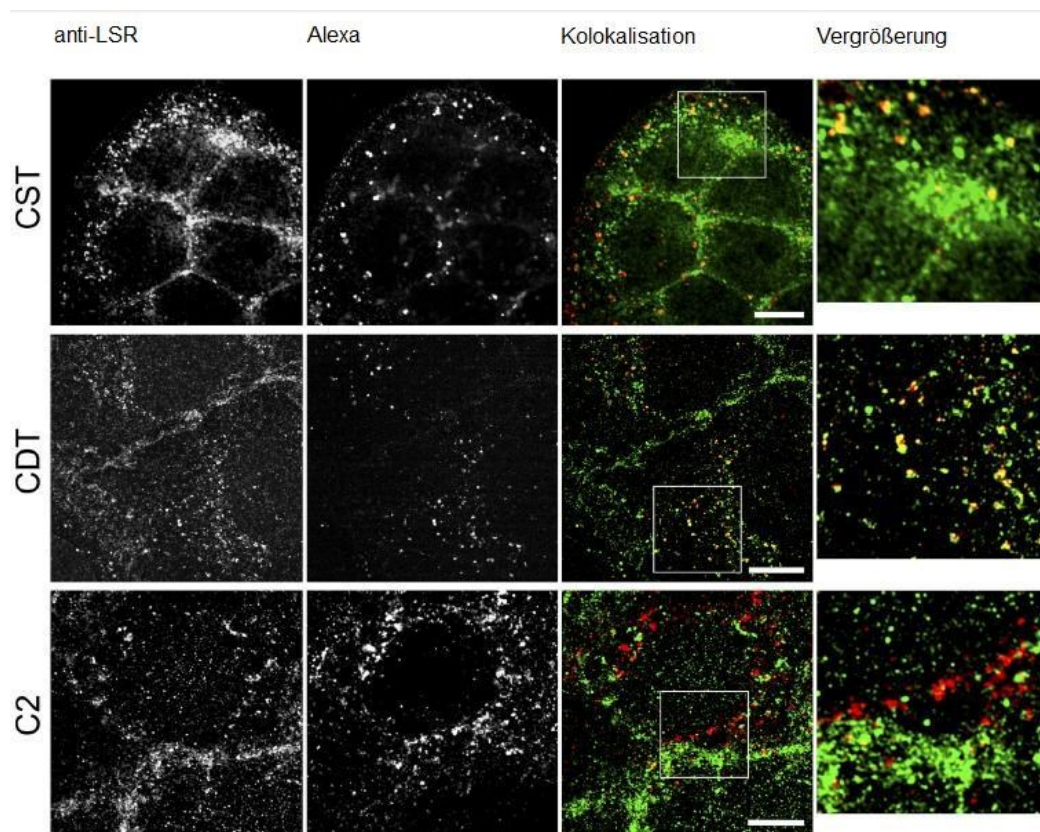


Abb. 15 Kolokalisationsstudien CaCo2-Zellen wurden zunächst für 15 min auf 4°C belassen um die Bindung des Toxins an den Rezeptor auf der Zelloberfläche zu gewährleisten und anschließend für 20 min bei 37°C inkubiert, um die Endozytose des Rezeptor/Toxin-Komplexes zu induzieren. rot: CST, CDT, C2; grün: LSR; gelbe Signale im Kästchen zeigen die Kolokalisation von Alexa-Signalen mit dem Antikörper-fluoreszenzgefärbten LSR

4 DISKUSSION

1. LSR ist der zelluläre Oberflächenrezeptor von CST

Die vorliegende Dissertation liefert starke Hinweise, dass LSR ebenfalls das Zielprotein für die Bindung und Internalisierung des *C. spiroforme* Toxins ist.

Die Beweisführung basierte auf H1-HeLa-Zellen, die kein LSR exprimieren und so eine erhöhte Resistenz gegenüber den CST-verwandten Toxinen CDT und Iota-Toxin zeigen, welche nicht mehr besteht, wenn LSR ektopisch exprimiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Vergiftung von H1-HeLa-Zellen mit CST und die Bindung des Toxins an diese Zellen, strikt abhängig von der Anwesenheit von LSR ist.

Die Rolle von LSR in der zellulären Aufnahme von CST konnte konkretisiert werden, indem eine weitere Zelllinie, CaCo2-Zellen, für Kollokalisationsstudien verwendet wurde. Dabei konnte ein überlappendes Fluoreszenz-Signal von Alexa-markiertem Toxin und Antikörper-detektiertes LSR in endozytischen Vesikeln nachgewiesen werden.

LSR ist somit der zelluläre Oberflächenrezeptor für alle Mitglieder der Iota-Toxin-Familie.

2. Zwei Theorien zur Bindung der Toxine an den Rezeptor und Lipid Rafts

Zur Bildung der porenbildenden Heptamere existieren zwei Modelle. Eine Reihe von Studien, hauptsächlich am Iota-Toxin durchgeführt, sprechen dafür, dass die B-Komponenten der Iota-Toxin-Familie zunächst einzeln an den zellulären Oberflächenrezeptor binden, durch zelluläre Proteasen aktiviert werden und in der Folge porenbildende Heptamere bilden. Das andere Modell schlägt vor, dass sich Heptamere aus B-Komponenten, vor der Bindung an den Rezeptor formen (BARTH *et al.* 2000). Eine endgültige Antwort konnte bislang nicht gegeben werden.

Erst kürzlich konnte im Labor von Prof. Aktories anhand der Bindekomponente CDTb von *C. difficile* gezeigt werden, dass die Bindung von CDTb an die Zelloberfläche zur Akkumulation des LSR in den Lipid-Rafts führt

(PAPATHEODOROU et al. 2013). Lipid-Rafts sind Cholesterin-reiche Mikrodomänen in Zellmembranen.

NAGAHAMA et al. (2004) und HALE et al. (2004) konnten nachweisen, dass die Porenbildung durch die B-Komponenten der Iota-Toxine mit Lipid-Rafts assoziiert ist.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Rezeptorbindedomäne von CDTb allein sowie der Vorläufer von CDTb, welche nicht zur Oligomerisierung im Stande ist, beide die Akkumulation von LSR in den Lipid-Rafts auslösen können. Dieses Ergebnis unterstützt das Model, welches besagt, dass die Oligomerisierung der B-Komponenten auf der Zelloberfläche stattfindet. Zudem scheint die lokale Ansammlung der LSR-gebundenen Monomere in den Lipid Rafts, die Oligomerisierung zu verstärken.

3. Ausblick zur Therapie von Clostridien-induzierten Erkrankungen

C. spiroforme ist einer der Hauptpathogene des Gastrointestinaltrakts von Kaninchen und kann zu einer ernsten hämorrhagischen Enterocolitis mit akutem und meist ungünstigem Verlauf führen.

Aus einer Studie über Antibiotikaempfindlichkeit von *C. spiroforme* (AGNOLETTI et al. 2009) geht hervor, dass die Anzahl der Antibiotika, welche gegen *C. spiroforme* wirksam sind, durch Resistenzbildung der Clostridien abnimmt.

Eine geringe Anzahl an Antibiotika, die von Kaninchen gut vertragen werden und eine steigende Anzahl an Resistenzen, machen es unumgänglich sich Alternativen zur Behandlung von *C. spiroforme*-assoziierten Durchfällen zu überlegen. Wegen der steigenden Resistenzbildung gegenüber *C. spiroforme* ist es nicht anzustreben ständig zu „neuen“ Antibiotika zu wechseln. Grundsätzlich andere Wirkprinzipien sollten ebenfalls reflektiert werden.

Nachdem der LSR als Rezeptor für die Zellaufnahme von Vertretern der Iota-Toxin-Familie identifiziert wurde, sollten in Zukunft, v. a. im humanmedizinischen Bereich, auch Rezeptor-spezifische Ansätze für die Therapie oder Prophylaxe von Erkrankungen, die durch *C. difficile* oder *C. perfringens* verursacht werden, geprüft werden.

Sollte es in Zukunft einen Wirkstoff geben, der die Bindung der Toxine an den Rezeptor im Darm kompetitiv hemmen kann und sich als nicht schädlich erweist, wird dies sicher auch interessant für die Veterinärmedizin sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Claudia Johanna Wilczek

Identifizierung des zellulären Rezeptors für das binäre Toxin von *Clostridium spiroforme*

Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig; Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Eingereicht im Dezember 2013

51 Seiten, 15 Abbildungen, 42 Literaturangaben

Schlüsselwörter: *Clostridium spiroforme* Toxin, Lipolyse-stimulierter Lipoproteinrezeptor, clostridiale binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine

Erst kürzlich wurde der Lipolyse-stimulierte Lipoproteinrezeptor (LSR, engl. *lipolysis-stimulated lipoprotein receptor*) als der zelluläre Oberflächenrezeptor von CDT und Iota-Toxin, zweier Vertreter der Iota-Toxin-Familie der clostridialen Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine, identifiziert. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob CST, ein weiterer Vertreter der Iota-Toxin-Familie, ebenfalls LSR für den Zelleintritt nutzt.

Zunächst wurden die Toxinkomponenten CSTa und CSTb erstmals rekombinant hergestellt. Dazu wurden die für CSTa und CSTb codierenden Genabschnitte mittels PCR amplifiziert und anschließend in einen Expressionsvektor kloniert. Als Expressionsvektor wurde in dieser Arbeit der pHis1522-Vektor verwendet. Zur Amplifizierung wurden die Plasmide in *E. coli* transformiert und anschließend aufgereinigt. Die Proteinexpression erfolgte in *B. megaterium*, weil dieses Bakterium sich bereits zur Expression anderer

ZUSAMMENFASSUNG

clostridialer Toxine bewährt hatte. Zur Aufreinigung der 6xHis-getaggtten Proteine wurde die Nickel-Affinitätschromatographie eingesetzt.

Als nächstes wurde gezeigt, dass die rekombinant hergestellten Toxinkomponenten CSTa und CSTb biologisch aktiv waren. Dazu wurden CaCo2-Zellen mit CST behandelt und anschließend die Morphologie der Zellen untersucht. CaCo2-Zellen, die mit CSTa und CSTb behandelt wurden, wiesen Vergiftungserscheinungen wie eine typische Zellabrundung auf. Mit dem „Aktin-Nach-ADP-Ribosylierungs-Assay“ und der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von TRITC-Phalloidin-gefärbtem Aktin wurde gezeigt, dass das rekombinant hergestellte CST Aktin-ADP-ribosylierende Eigenschaften besaß.

Nachdem gezeigt war, dass rekombinant hergestelltes CST sich wie ein biologisch aktives, binäres Aktin-ADP-ribosylierendes Toxin verhält, konnte mithilfe der Vergiftung von H1-HeLa(+LSR)-Zellen und nativen H1-HeLa-Zellen, die kein LSR exprimierten, nachgewiesen werden, dass die Wirkung des Toxins LSR-abhängig ist. FACS-Analysen und Kolokalisationsstudien mit Alexa488-gefärbtem CSTb und Antikörper-gefärbtem LSR erbrachten zusätzlich den Beweis, dass CSTb auf der Zelloberfläche an LSR bindet und bei der Aufnahme in die Zellen mit LSR in endozytischen Vesikeln kolokalisiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das *C. spiroforme* Toxin (CST) ebenfalls LSR als Rezeptor für den Zelleintritt verwendet.

6 SUMMARY

Claudia Johanna Wilczek

Identification of the cellular receptor of *Clostridium spiroforme* toxin

Institute of Bacteriology and Mycology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Leipzig; Institute for Experimental and Clinical Pharmacology
and Toxicology, University of Freiburg

Submitted in December 2013

51 pages, 15 figures, 42 references

Keywords: *Clostridium spiroforme* toxin, lipolysis-stimulated lipoprotein
receptor, clostridial binary actin-ADP-ribosylating toxins

Recently, the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor was identified as the cell-surface receptor of CDT and Iota-Toxin, two members of the Iota-like toxin family of clostridial actin-ADP-ribosylating toxins. The aim of this study was to investigate, whether CST, which is an additional member of the Iota-like toxin family, also targets LSR for entry into host cells.

First, the toxin components CSTa and CSTb were recombinantly produced. To this end, the encoding genes of CSTa and CSTb were amplified by polymerase chain reaction and the PCR products were further cloned into an expression vector. As expression vector pHIS1522 was used in this study. For amplification, the plasmids were transformed into *E.coli*, followed by purification. The protein expression was performed in *B. megaterium*, since this bacterium has been used already successfully in the expression of other clostridial toxins. Nickel affinity chromatography was applied to purify the 6xHis-tagged proteins.

Subsequently, it was shown in this study that the recombinantly produced toxin components CSTa and CSTb were able to constitute a fully functional binary toxin. For this purpose, CaCo2 cells were first treated with CST and then the cell morphology was analysed. CaCo2 cells that were treated with CSTa and

SUMMARY

CSTb displayed typical intoxication characteristics, e.g. cell rounding. It was shown by post-ADP-ribosylation of actin and fluorescence microscopic analysis of TRITC-phalloidin labeled actin that recombinantly produced CST exhibited actin-ADP-ribosylating activity.

Following the proof that recombinantly produced CST acts as a biologically active, binary, actin-ADP-ribosylating toxin, it was shown by intoxication of H1-HeLa(+LSR) cells and native H1-HeLa cells, which do not produce LSR, that the effect of the toxin depends on LSR. In addition, FACS analyses and colocalization studies with Alexa488-labeled CSTb and antibody-labeled LSR revealed that CSTb binds at the cell surface to LSR and colocalizes with LSR during toxin uptake in endocytic vesicles.

The results of this study show that *C. spiroforme* toxin (CST) also targets the receptor LSR for host cell entry.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Agnoletti F, Ferro T, Guolo A, Marcon B, Cocch M, Drigo I, Mazzolini E, Bano L. A survey of *Clostridium spiroforme* antimicrobial susceptibility in rabbit breeding. *Vet Microbiol.* 2009; 136: 188-91.

Aktories K, Bärman M, Ohishi I, Tsuyama S, Jakobs KH, Habermann E. Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature.* 1986; 322: 390-2.

Aktories K, Schwan C, Papatheodorou P, Lang AE. Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. *Toxicon.* 2012; 60: 572-81.

Aktories K, Just I. Botulinum C2 toxin. In. 1990. ADP-ribosylating Toxins and G Proteins: Insights into Signal Transduction. Moss J, Vaughan M. American Society for Microbiology, Washington D.C. 79-95.

Aktories K, Wegner A. Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins. *Mol. Microbiol.* 1992; 6: 2905-8.

Barth H, Blocker D, Behlke J, Bergsma-Schutter W, Brisson A, Benz R, Aktories K. Cellular uptake of *Clostridium botulinum* C2 toxin requires oligomerization and acidification. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 18704-11.

Blocker D, Behlke J, Aktories K, Barth H. Cellular uptake of the *Clostridium perfringens* binary iota-toxin, *Infect. Immun.* 2001; 69:2980-7

Borriello SP, Carman RJ. Association of iota-like toxin and *Clostridium spiroforme* with both spontaneous antibiotic-associated diarrhea and colitis in rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 17: 414-8.

Carman RJ, Borriello SP. *Clostridium spiroforme* isolated from rabbits with diarrhoea. *Vet. Rec.* 1982; 111: 461-2.

Carman RJ, Borriello SP. Infectious nature of *C. Spiroforme*-mediated rabbit enterotoxaemia. *Vet. Microbiol.* 1984; 9: 497-502.

Carman RJ, Evans RH. Experimental and spontaneous clostridial enteropathies of laboratory and free living lagomorphs. *Lab. Anim. Sci.* 1984; 34: 443-52.

Gilbert M, Monier MN, Ruez R, Hale ML, Stiles BG, Benmerah A, Johannes L, Lamaze C, Popoff MR. Endocytosis and toxicity of clostridial binary toxins depend on a clathrin-independent pathway regulated by Rho-GDI. *Cell. Microbiol.* 2011; 13:154-70.

Guttenberg G, Papatheodorou P, Genisyuerk S, Lü W, Jank T, Einsle O, Aktories K. Inositol hexakisphosphate-dependent processing of *Clostridium sordellii* lethal toxin and *Clostridium novyi* alpha-toxin. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 14779 –86.

Hahn H, Kaufmann S, Schulz T, Suerbaum S. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2009. p. 336.

Hale ML, Marvaud JC, Popoff MR, Stiles BG. Detergent-resistant membrane microdomains facilitate Ib oligomer formation and biological activity of *Clostridium perfringens* iota-toxin. *Infect. Immun.* 2004; 72: 2186-93.

Kaiser E, Kroll C, Ernst K, Schwan C, Popoff M, Fischer G, Buchner J, Aktories K, Barth H. Membrane translocation of binary actin-ADP-ribosylating toxins from *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* is facilitated by cyclophilin A and Hsp90. *Infect. Immun.* 2011; 79: 3913-21.

Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, Furuse M. LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *Cell. Sci.* 2011; 124: 548-55.

Meinhardt F, Stahl U, Ebeling W. Highly efficient expression of homologous and heterologous genes in *Bacillus megaterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989; 30: 343-50.

Mesli S, Javorschi S, Bérard AM, Landry M, Priddle H, Kivlichan D, Smith AJ, Yen FT, Bihain BE, Darmon M. Distribution of the lipolysis stimulated receptor in adult and embryonic murine tissues and lethality of LSR^{-/-} embryos at 12.5 to 14.5 days of gestation. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271: 3103-14.

Nagahama M, Nagayasu K, Kobayashi K, Sakurai J. Binding component of *Clostridium perfringens* iota-toxin induces endocytosis in Vero cells. *Infect. Immun.* 2002; 70: 1909-14.

Nagahama M, Yamaguchi A, Hagiyaama T, Ohkubo N, Kobayashi K, Sakurai J. Binding and internalization of *Clostridium perfringens* iota-toxin in lipid rafts, *Infect. Immun.* 2004; 72: 3267-75.

Ohishi I, Iwasaki M, Sakaguchi G. Vascular permeability activity of botulinum C2 toxin elicited by cooperation of two dissimilar protein components. *Infect. Immun.* 1981; 31: 890-5.

Ohishi I. Activation of botulinum C2 toxin by trypsin. *Infect. Immun.* 1987; 55: 1461-5.

Papatheodorou P, Zamboglou C, Genisyuerk S, Guttenberg G, Aktories K. Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One.* 2010; 5:e10673.

Papatheodorou P, Carette JE, Bell GW, Schwan C, Guttenberg G, Brummelkamp TR, Aktories K. Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *PNAS.* 2011; 108: 16422-7.

Papatheodorou P, Hornuss D, Nölke T, Hemmasi S, Castonguay J, Picchianti M, Aktories K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT induces clustering of the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor into lipid rafts. *MBio.* 2013; 4(3):e00244-13.

Petosa C, Collier RJ, Klimpel KR, Leppla SH, Liddington RC. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* 1997; 385: 833-8.

Reuner KH, Presek P, Boschek CB, Aktories K. Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin and disorganizes the microfilament network in intact cells. *Eur. J. Cell Biol.* 1987; 43: 134-40.

Rood JI, McClane BA, Songer JG, Titball RW. *The Clostridia, Molecular Biology and Pathogenesis.* San Diego, California: Academic Press; 1997. p.365.

Rygus T, Hillen W. Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991; 35: 594-9.

Schleberger C, Hochmann H, Barth H, Aktories K, Schulz GE. Structure and action of the binary C2 toxin from *Clostridium botulinum*. *J. Mol. Biol.* 2006; 364: 705-15.

Schneider T, Eckmanns T, Ignatius R, Weist K, Liesenfeld O.

Clostridium difficile-assoziierte Diarrhoe- ein zunehmendes klinisches Problem durch hochvirulente Stämme. *Dtsch. Arztl.* 104. 2007.

- Schwan C, Nölke T, Kruppke AS, Schubert DM, Lang AE, Aktories K. Cholesterol- and sphingolipid-rich microdomains are essential for microtubule-based membrane protrusions induced by *Clostridium difficile* transferase (CDT). *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 29356 –65.
- Stiles BG, Hale ML, Marvaud JC, Popoff MR. *Clostridium perfringens* iota toxin: binding studies and characterization of cell surface receptor by fluorescence-activated cytometry. *Infect. Immun.* 2000; 68: 3475-84.
- Stiles BG, Male ML, Marvaud JC, Popoff MR. *Clostridium perfringens* iota toxin: characterization of the cell-associated iota b complex. *Biochem. J.* 2002; 367:801-8.
- Stiles BG, Wigelsworth DJ, Popoff MR, Barth H. Clostridial binary toxins: Iota and C2 family portraits. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 2011; 1: 11.
- Wegner A, Aktories K. ADP-ribosylated actin caps the barbed ends of actin filaments. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 13739-13742.
- Weigt C, Just I, Wegener A, Aktories K. Nonmuscle actin ADP-ribosylated by botulinum C2 toxin caps actin filaments. *FEBS Lett.* 1989; 246: 181- 4.
- Yang G, Zhou B, Wang J, He X, Sun X, Nie W, Tzipori S, Feng H. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A and B in *Bacillus megaterium*. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 192.
- Yen FT, Mann CJ, Guermani LM, Hannouche NF, Hubert N, Hornick CA, Bordeau VN, Agnani G, Bihain BE. Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. *Biochemistry.* 1994; 33: 1172-80.
- Yen FT, Masson M, Clossais-Besnard N, André P, Grosset JM, Bougueleret L, Dumas JB, Guerassimenko O, Bihain BE. Molecular cloning of a lipolysis-stimulated remnant receptor expressed in the liver. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 13390-8.
- Young JA, Collier RJ. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu. Rev. Biochem.* 2007; 76: 243-65

BETEILIGTE PERSONEN

Diese Arbeit wurde durch Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories und Dr. Panagiotis Papatheodorou am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg betreut sowie die hieraus entstandene Publikation von Ihnen verfasst (*Papatheodorou P, Wilczek C, Nölke T, Guttenberg G, Hornuss D, Schwan C, Aktories K. Identification of the cellular receptor of Clostridium spiroforme toxin. Infekt Immun. 2012 Apr; 80 (4): 1418-23*).

Thilo Nölke und Dr. Carsten Schwan haben die mikroskopischen Bilder der von mir angefertigten fluoreszenzgefärbten Präparate durchgeführt.

Die Aufreinigung von CSTa und CSTb wurde unter Anleitung von Dr. Gregor Guttenberg von mir selbst durchgeführt.

Die Erarbeitung der Klonierungsstrategie erfolgte unter Hilfe von Daniel Hornuss.

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Bruder, meiner Mama und meiner Oma bedanken, dafür dass sie immer für mich da waren und sind! Hab euch lieb!!!

Als Nächstes gilt mein Dank natürlich Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories, der es mir ermöglicht hat diese Arbeit in seinem Institut durchzuführen!!

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner netten Doktormutter aus Leipzig, Frau Prof. Dr. Monika Krüger!!

Ein großes Dankeschön geht zudem an Frau Rositta Kunze und an Frau Schrödl!

Bedanken möchte ich mich auch bei dem mit Sicherheit besten Betreuer den man sich wünschen kann, Herr Dr. Panagiotis Papatheodorou!

Danke an meine Kollegen aus der Arbeitsgruppe AG Dimi, welche mittlerweile z. T. zu sehr guten Freunden geworden sind. Danke Simon, Daniel, Sven, Oti, Bernd und Gregor!

Lieben Dank natürlich auch an alle anderen Mitarbeiter der Abteilung 1 des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. Danke vor allem an Thilo, Jürgen, Carsten Schwan und Peter Gebhardt!

Außerdem möchte ich mich bei meinem ehemaligen Chef, Herr Dr. E. v. Cramm und bei meiner damaligen Kollegin und Freundin Ini bedanken!

Ein besonderer Dank gilt natürlich und vor allem meinen Freunden! Danke Bianca, Ela, Miri, Dani, Meli, Angie, Meike, Ö, Andi, Nici, Philip und Simon!

Ein von Herzen kommendes Dankeschön an die wichtigste Person an dieser Stelle, danke an Marius!

Danke an meinen Hund Bobo für seine Geduld!